República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 0712914-9 A2**

BRPI0712914A2

(22) Data de Depósito: 27/02/2007
(43) Data da Publicação: 09/10/2012
(RPI 2179)

(51) Int.Cl.:
C12N 9/42
C12N 15/82
A01H 5/00
C12P 7/06
C12P 7/08

(54) Título: COLHEITAS DE ENERGIA PARA ESTOQUES DE ALIMENTAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL APERFEIÇOADOS

(30) Prioridade Unionista: 27/02/2006 US 60/777,191, 21/07/2006 US 60/832,410, 21/07/2006 US 60/832,410, 27/02/2006 US 60/777,191

(73) Titular(es): Edenspace System Corporation

(72) Inventor(es): Bruce W. Ferguson, David A.Lee, Michael J. Blaylock

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007005364 de 27/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/100897de 07/09/2007

(57) Resumo: COLHEITAS DE ENERGIA PARA ESTOQUES DE ALIMENTAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL APERFEIÇOADOS. A presente invenção refere-se a sistemas e métodos aperfeiçoados para redução de custos e aumento de rendimentos de etanol celulósico. Em particular, a presente invenção proporciona plantas geneticamente transformada para biomassa aumentada, expressão de enzimas lignocelulíticas, e simplificação de colheita e processamento a jusante. São também providos métodos para uso destas plantas transgências na produção de estoques de alimentação limpos, comercializáveis, para produção de combustíveis renováveis e químico, e, outras aplicações, incluindo fitoremediação.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COLHEITAS DE ENERGIA PARA ESTOQUES DE ALIMENTAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL APERFEIÇOADOS".**

Pedidos de Patente Relacionados

O presente pedido de patente reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório U.S.S.N. 60/777.191, depositado em 27 de fevereiro de 2006, e Pedido Provisório U.S.S.N. 60/832.410, depositado em 21 de julho de 2006. Cada um dos Pedidos de Patente Provisórios, intitulados "Colheitas de Energia para Estoques de Alimentação de Biocombustível Aperfeiçoados", é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Suporte do Governo

O trabalho aqui descrito foi financiado pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (Deferimento Nº DE-FG02-04ER86183). O governo dos Estados Unidos pode ter certos direitos na invenção.

Antecedentes da Invenção

Em 2004, a produção de etanol nos Estados Unidos alcançou um registro de 3,35 bilhões de galões; acima de 19% de 2003 (S. Hilgren, "An ambitious energy goal", Farm J., Jan. 2005, p. 58). Enquanto seja ainda uma parte pequena do mercado de combustível total dos Estados Unidos, menos do que 4% dos mais do que 140 bilhões de galões de gasolina vendida em 2006, o aumento rápido recente nos preços do óleo tem aumentado seu custo-competitividade, e indica que ele continua a capturar parte do mercado. Agências federais, tal como o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), começaram a implementar programas de obtenções preferidos de biocombustíveis, tal como etanol, como um aditivo de combustível. O mercado potencial para a tecnologia - combustível de transporte - é um dos maiores na economia dos Estados Unidos.

A capacidade de produzir etanol de biomassa de baixo custo foi denominada a "chave" de se produzir etanol competitivo como um aditivo de gasolina (J. DiPardo, "Outlook for biomass ethanol production and demand", EIA Forecast, 2002), com estudos de junta USDA/DOE que prevêem a capacidade de produzir até 50 bilhões de galões de etanol por ano da gleba de

terra cultivada dos Estados Unidos (A. McAloon et al., "Determining the cost of producing ethanol from corn", 2000, NREL/T-580-28893), e aproximadamente 100 bilhões de galões por ano de terra florestal e agrícola combinadas (R. D. Perlack et al., "Biomass as a feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply", 2005, ORNL/TM-2005/66). A produção lignocelulósica também ajudaria a aumentar o balanço de energia líquido de etanol de milho, recentemente estimada em uma descarga/admissão de energia de 1,67 (H. Shapouri et al., "2001 net energy balance of corn-ethanol (preliminary report)", USDA, Office of the Chief Ecomomist). A conversão de estoques de alimentação lignocelulósicos em etanol tem as vantagens da pronta disponibilidade de grandes quantidades de estoque de alimentação, o desejo de se evitar queima ou enchimento de terra dos materiais, e a conversão relativamente fácil de glicose, produzida por hidrólise de celulose, no etanol. Como um resultado, muitos estudos mostram vantagens de energia substanciais a partir do uso de estoques de alimentação celulósicos (por exemplo, Farrell et al., Science, 2006, 311:506-508).

Hoje muito do combustível etanol é produzido de grão de milho, que é moído, pré-tratado com calor e ácido para quebrar lignina e celulose, tratado com enzimas amilase para hidrolizar amido em açúcares, fermentado, e destilado. A possibilidade de aumentar rendimentos de energia pela hidrolização da celulose em forragem de milho, ou outra biomassa de planta, foi estudada intensivamente sobre a última década. Enquanto progresso substancial tem sido produzido na redução de custos, dois desafios substanciais permanecem. O primeiro é reduzir os custos de pré-tratamento da biomassa para remover lignina e hemicelulose. Novas técnicas, tais como explosão de fibra de amônia (AFEX), proporcionam altos rendimentos, mas ainda impõem alto capital e custos de operação, e pré-tratamentos em geral criam a necessidade de dispor de grandes quantidades de subprodutos, tal como sulfato de cálcio. Segundo, o custo de enzimas de celulase microbialmente produzidas hoje varia de $0,30 a mais do que $1,00 por galão de etanol. Enquanto a pesquisa atual possa trazer este custo abaixo de um alvo de

$0,10 por galão, custos ainda mais baixos são desejáveis para aperfeiçoar a competitividade do custo do etanol com combustíveis fósseis.

Claramente, técnicas aperfeiçoadas são ainda necessárias para reduzir o custo de estoques de alimentação de biocombustível para produção de etanol.

Sumário da Invenção

A presente invenção é dirigida a novas introduções que tratam das limitações atuais de produção de bioenergia. Em particular, a presente invenção se refere a sistemas aperfeiçoados e estratégias para redução de custos e aumento de rendimentos de etanol celulósico. Mais especificamente, a invenção geralmente envolve plantas geneticamente projetadas para ambas as biomassa aumentada e expressão de enzimas lignocelulósicas, uma introdução que resulta em inovações de processo a jusantes na produção de etanol. Em adição, a produção de estoques de alimentação comercializáveis limpos para bioenergia, a introdução da invenção pode aperfeiçoar significantemente o estado da técnica atual na recuperação de contaminante a partir de colheitas de fitoremediação, permitindo tratamento de biomassa contaminada para reduzir os custos e responsabilidades associadas com disposição de aterro de lixo, e capacitando o reciclo de metais recuperados.

Mais especificamente, em um aspecto, a presente invenção proporciona uma planta transgênica, o genoma da qual é aumentado com um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima lignocelulolítica operavelmente ligada a uma seqüência promotora, no qual o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta, no qual a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é produzida em um nível maior do que 5% da proteína solúvel total, maior do que 10% da proteína solúvel total, ou maior do que 20% da proteína solúvel total.

A pelo menos uma enzima lignocelulolítica pode ser uma celulase, uma hemicelulase, uma ligninase, ou uma combinação destas. Em algumas concretizações, a enzima lignocelulolítica exibe baixa atividade a uma temperatura abaixo de 30°C, abaixo de 50°C, ou abaixo de 60C. A enzima

lignocelulolítica pode ser expressa constitutivamente ou especificamente em tecido. Por exemplo, a enzima lignocelulolítica pode ser expressa em um tecido de planta selecionado a partir do grupo consistindo em talos e folhas. A enzima lignocelulolítica pode ser expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela, tais como apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo.

A planta pode ser uma planta monocotiledônia ou dicotiledônia. Em certas concretizações, a planta é uma planta de colheita. A planta pode ser selecionada a partir do grupo consistindo em milho, grama, sorgo, "miscanthus", cana de açúcar, álamo, pinho, trigo, arroz, soja, algodão, cevada, grama de relvado, tabaco, bambu, colza, beterraba, girassol, salgueiro e eucalipto.

Em algumas concretizações, o genoma de uma planta transgênica da invenção é adicionalmente aumentado com um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima de amilase operavelmente ligada a uma seqüência promotora, no qual o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta. A enzima amilase pode ser enzima alfa-amilase ou enzima glucoamilase. Em certas concretizações, a pelo menos uma amilase é produzida em um nível maior do que 10% da proteína solúvel total, maior do que 25% da proteína solúvel total, ou maior do que 50% da proteína solúvel total. A amilase pode ser expressa constitutivamente ou especificamente em tecido (por exemplo, em talos e folhas). A amilase pode ser expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela (por exemplo, apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo).

Em algumas concretizações, o genoma de uma planta transgênica da invenção é adicionalmente aumentado com um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma proteína com propriedades antimicrobiais operavelmente ligada a uma seqüência promotora, no qual o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta. A proteína pode compreender um antibiótico. Em certas concretizações, a pelo menos uma proteína com propriedades anti- microbiais é produzida em um nível maior do que 0,1% da proteína solúvel total, maior do que 1% da proteína solúvel total, ou

maior do que 10% da proteína solúvel total. A proteína bacterial pode ser expressa constitutivamente ou especificamente em tecido (por exemplo, em sementes, talos e/ou folhas). A proteína anti-microbial pode ser expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela (por exemplo, apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo). A proteína anti-microbial pode ser efetiva contra espécies bacteriais ou fúngicas que reduzem as produções de etanol durante processamento pela produção de substâncias que são tóxicas a micróbios de fermentação, ou pelo consumo de glicose e redução de glicose disponível para fermentação em etanol.

Em algumas concretizações, o genoma de uma planta transgênica da presente invenção é adicionalmente aumentado com um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima para conversão de açúcares de difícil fermentação em açúcares mais facilmente fermentáveis ligados operavelmente a uma seqüência promotora, no qual o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta. A enzima pode ser um isomerase que converte xilose em xilanose. Em certas concretizações, a enzima é produzida em um nível maior do que 0,5% da proteína solúvel total, maior do que 5% da proteína solúvel total, maior do que 10% da proteína solúvel total, ou maior do que 20% da proteína solúvel total.

O genoma de uma planta transgênica da invenção também pode ser adicionalmente alterado de modo a minimizar dispersão dos transgenes através da reprodução da planta. Por exemplo, o genoma de plantas transgênicass da invenção pode ser alterado de modo a introduzir esterilidade macho ou esterilidade total na planta, ou retardar a floração da planta.

O genoma de uma planta transgênica da invenção pode ser adjcionalmente alterado de modo a reduzir a quantidade de uma ou mais formas de lignina na planta transgênica em relação à celulose e a hemicelulose, ou de modo a aumentar a quantidade de uma ou mais formas de celulose na planta transgênica em relação à lignina e hemicelulose, ou de modo a aumentar a quantidade de uma ou mais formas de hemicelulose na planta transgênica em relação à lignina e celulose.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma planta

transgênica, o genoma da qual é aumentado com um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima lignocelulítica operavelmente ligada a uma seqüência promotora, no qual o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta, e um polinucleotídeo recombinante que reduz a expressão de um gene promotor de uma flor, ou que aumenta um gene repressor de flor, operavelmente ligado a um promotor. Em tal planta transgênica, a floração da planta é retardada, e/ou a produção de biomassa é intensificada.

Em certas concretizações, a pelo menos uma enzima lignocelulítica é produzida em um nível maior do que 0,5% da proteína solúvel total, maior do que 5% da proteína solúvel total, maior do que 10% da proteína solúvel total, ou maior do que 20% da proteína solúvel total. A pelo menos uma enzima lignocelulolítica pode ser uma celulase, uma hemicelulase, uma ligninase, e combinações destas. Conforme mencionado acima, a pelo menos uma enzima lignocelulolítica pode ser expressa constitutivamente ou especificamente em tecido; e/ou pode ser expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela.

Conforme mencionado acima, a planta pode ser uma planta monocotiledônea, ou uma planta dicotiledônea. Em certas concretizações, a planta é uma planta de colheita. A planta pode ser selecionada a partir do grupo consistindo em milho, grama, sorgo, "miscanthus", cana de açúcar, álamo, pinho, trigo, arroz, soja, algodão, cevada, grama de relvado, tabaco, bambu, colza, beterraba, girassol, salgueiro e eucalipto.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um método pata preparação com custo efetivo de etanol. O método da invenção compreende as etapas de: tratar uma parte de planta compreendendo pelo menos uma enzima lignocelulítica sob condições para ativar a pelo menos uma enzima lignocelulítica, degradando, desse modo, lignocelulose, para formar uma mistura de hidrolizato, no qual a parte de planta é obtida a partir de uma planta transgênica da invenção, e incubar a mistura de hidrolizato sob condições que promovam conversão de açúcares fermentáveis da mistura de hidrolizato em etanol. Em algumas concretizações, a parte de planta é subs-

tancialmente livre de sujidades do solo.

Em certas concretizações, antes da etapa de tratamento, a parte de planta não é pré-tratada ou é pré-tratada sob condições de menos calor ou menos ácido, ou condições que são, de outro modo, menos severas, ou produzem menos subprodutos tóxicos do que as condições usadas no pré-tratamento de biomassa de plantas não-transgênicas. Por exemplo, a parte de planta pode ser pré-tratada pelo aquecimento da parte de planta a uma temperatura maior do que 50°C, maior do que 75°C, ou maior do que 100°C. Adicionalmente ou alternativamente, a parte de planta pode ser pré-tratada pela adição de água para diminuir a viscosidade da mistura de hidrolizato. Adicionalmente ou alternativamente, a parte de planta é pré-tratada pelo corte, moagem, desfibramento ou pulverização da parte de planta.

Em algumas concretizações, o método compreende adicionalmente adição de enzimas lignocelulíticas externas à parte de planta antes da etapa de tratamento. Tal método resultará em produção aumentada de etanol comparada a um método no qual a parte de planta é obtida de uma planta não-transgênica.

Em certas concretizações, o método da invenção compreende adicionalmente remoção de pelo menos um componente não-fermentável a partir da mistura de hidrolizato antes da etapa de incubação (fermentação). A remoção do pelo menos um componente não-fermentável pode acelerar a conversão de açúcares fermentáveis em etanol. O pelo menos um componente não-fermentável pode ser selecionado a partir do grupo consistindo em lignina, produtos de quebra de lignina, fenóis, furanos, e combinações destes. A remoção do pelo menos um componente não-fermentável a partir da mistura de hidrolizato pode compreender separação/isolamento e purificação do componente não-fermentável. Em certas concretizações, após remoção, o pelo menos um componente não-fermentável, ou um derivado deste, é queimado para produzir calor ou eletricidade. O calor, desse modo, produzido pode ser usado no método da invenção de produção de etanol, por exemplo, para aquecer a mistura de hidrolizato e/ou destilar etanol.

Em algumas concretizações, o método da invenção compreende

adicionalmente uma etapa de: destilar o etanol produzido por conversão de açúcares fermentáveis da mistura de hidrolizato de modo a obter etanol destilado. Um ou mais componentes não-fermentáveis pode ser adicionado ao etanol destilado como um desnaturante. O um ou mais componentes não-fermentáveis pode ser adicionado ao etanol antes da etapa de destilação, destilado com o etanol, e pode permanece no etanol destilado como um desnaturante. Alternativamente ou adicionalmente, um ou mais componentes não-fermentáveis pode ser processado em compostos (por exemplo, metanol, butanol, ou outros álcoois) que podem ser usados como desnaturantes.

Em algumas concretizações, o método da invenção compreende adicionalmente uma etapa de: destilar o etanol produzido por conversão de açúcares fermentáveis da mistura de hidrolizato de modo a obter etanol destilado, no qual o etanol destilado compreende um ou mais componentes não-fermentáveis que agem como desnaturantes.

Em certas concretizações, o processo de produção de etanol a partir da biomassa de planta transgênica produz adicionalmente um subproduto, tais como sólidos de grãos destiladores secos (DDGS), que tem valor mais alto de alimento, tais como níveis aumentados de proteína e óleo, resultantes de hidrólise e remoção de celulose ou hemicelulose, ou quebra ou remoção de lignina, presentes no subproduto de plantas não-transgênicas.

Em certas concretizações, o método compreende adicionalmente adicionar microorganismos, tais como microorganismos que fermentam açúcares de seis carbonos (por exemplo, glicose), ou açúcares de cinco carbonos (por exemplo, xilose), ou ambos, à parte de planta de modo a induzir sacarificação e fermentação simultâneas. Alternativamente ou adicionalmente, o genoma de plantas transgênicass usadas no método da invenção pode ser aumentado com genes de levedura ou genes de outros organismos de fermentação para promover sacarificação e fermentação simultâneas. Em outras concretizações, os microorganismos são adicionados à mistura de hidrolizato antes da fermentação.

Em certas concretizações, o método da invenção é efetuado u-

sando-se partes de planta de plantas transgênicass da mesma ou de espécies diferentes, contendo as mesmas ou enzimas diferentes. Estas plantas são co-processadas de modo a combinar as enzimas na proporção desejada para aumentar rendimento de etanol, tal como pelo alcance de hidrólise mais eficiente de polissacarídeos e quebra e remoção de lignina.

Em outras concretizações, o método da invenção é efetuado usando-se partes de planta obtidas de plantas transgênicass e plantas não-transgênicas usando-se equipamento comum e facilidades para colheita, ensilamento, corte, trituração, moagem, liquefação, sacarificação, fermentação, destilação, secagem, armazenamento ou transporte. Por exemplo, as partes de planta podem ser grão de milho e forragem de milho.

Em certas concretizações, o método da invenção compreende uma etapa de tratar a parte de planta sob condições que promovem hidrólise de amido. O tratamento da parte de planta sob condições que promovem hidrólise de amido pode compreender usar pelo menos uma enzima amilase, tal como glucoamilase, uma α-amilase, ou uma combinação destas. Em algumas concretizações, a etapa de tratar a parte de planta sob condições para ativar a pelo menos uma enzima lignocelulítica, e a etapa de tratar a parte de planta sob condições que promovam hidrólise de amido, são realizadas simultaneamente. Em outras concretizações, Em outras concretizações, a etapa de tratar a parte de planta sob condições para ativar a pelo menos uma enzima lignocelulítica, e a etapa de tratar a parte de planta sob condições para promover hidrólise de amido, são realizadas seqüencialmente. As partes de planta usadas em tais métodos podem ser obtidas de duas ou mais plantas transgênicass da invenção, e as plantas transgênicass podem ser da mesma ou de espécies diferentes, e podem produzir a mesma ou enzima lignocelulítica diferente. Alternativamente, as partes de planta podem ser obtidas de plantas transgênicass da invenção e plantas não-transgênicas. Em certas concretizações, a parte de planta compreende um ou mais de grão de milho, fibra de milho e forragem de milho. O método da invenção pode ser efetuado usando-se equipamento comum e facilidades para colheita, ensilamento, corte, trituração, moagem, liquefação, sacarifica-

ção, fermentação, destilação, secagem, armazenamento ou transporte. Em certas concretizações, o método da invenção é parte de um processo de moagem a seco.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de classificação para a identificação rápida de enzimas celulase microbiais que podem funcionar em plantas. Tais métodos compreendem o uso de tecidos de planta transientemente transformadas (por exemplo, folhas) para avaliação da atividade enzimática de enzimas celulase microbiais.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos para modificar seqüências de gene para expressão aumentada de celulases microbiais em plantas. Mais especificamente, os métodos da invenção compreendem etapas de: proporcionar uma seqüência de gene de polinucleotídeo microbial que codifica uma enzima lignocelulítica; calcular a média do uso de códon de cada uma de pelo menos uma primeira planta e uma segunda planta para obter um gabarito de uso de códon composto; e modificar a seqüência de gene de polinucleotídeo microbial usando o gabarito de uso de códon para gerar um polinucleotídeo otimizado de códon que codifica a enzima lignocelulítica, no qual o polinucleotídeo é otimizado para expressão em mais do que uma planta. Em certas concretizações, o polinucleotídeo é otimizado para expressão em duas plantas, três plantas, quatro plantas, ou mais do que quatro plantas. Em certas concretizações, pelo menos uma das plantas é planta monocot, e pelo menos uma das plantas é uma planta dicot. Em certas concretizações, o polinucleotídeo é otimizado para expressão em um grupo de plantas compreendendo milho, arabidopse, e tabaco.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona seqüências otimizadas de códon para vários genes microbiais. Em algumas concretizações, tais seqüências conduzem a transcrição aumentada em plantas. Em algumas concretizações, tais seqüências são otimizadas para a expressão em mais do que uma planta. Mais especificamente, a presente invenção proporciona um polinucleotídeo otimizado de códon isolado que codifica E1 endoglucanase compreendendo a seqüência de SEQ ID NO. 1; um polinucleotídeo otimizado de códon isolado que codifica família de 48 glicosídeos

hidrolase compreendendo a seqüência de SEQ ID NO. 2; e um polinucleotídeo otimizado de códon isolado que codifica família de 10 glicosídeos hidrolase compreendendo a seqüência de SEQ ID NO. 3, no qual o polinucleotídeo é otimizado para expressão em mais do que uma planta, isto é, em milho, arabidopse e tabaco. A invenção adicionalmente proporciona uma célula de planta, uma parte de planta, e uma planta que é transformada usando-se um destes polinucleotídeos otimizados de códon.

Em ainda outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para recuperação de contaminante em fitoremediação. O método da invenção compreende etapas de: introdução, em uma área contaminada, de sementes de uma planta transgênica da invenção; crescimento das plantas transgênicas a partir das sementes; colheita das plantas transgênicas crescidas; tratamento de uma parte de planta compreendendo pelo menos uma enzima lignocelulítica sob condições para ativar a pelo menos uma enzima lignocelulítica, degradando, desse modo, a lignocelulose, para formar uma biomassa, e liberando contaminante seqüestrado dentro da parte de planta, no qual a parte de planta é obtida a partir das plantas transgênicas crescidas colhidas; e recuperação do contaminante liberado a partir da parte de planta. O método pode compreender adicionalmente dispor a biomassa como desejo não-danoso.

O contaminante pode compreender um metalóide, tal como arsênico ou selênio, um metal pesado, tal como chumbo, cromo, cádmio, zinco, cobre, ou urânio, ou um poluente orgânico persistente, tais como DDT ou PCBs.

Em certas concretizações, antes da etapa de tratamento, a parte de planta não é pré-tratada ou é pré-tratada sob condições de calor e ácido que sejam menos severas do que condições usadas no pré-tratamento de biomassa de plantas não-transgênicas.

Estes e outros objetivos, vantagens e características da presente invenção tornar-se-ão aparentes àqueles técnicos no assunto tendo lido a seguinte descrição detalhada.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é um mapa do vetor pBI121 usado na transformação de tabaco conforme reportado no Exemplo 1. As seguintes seqüências são abreviadas; promotor NOS (N-p), neomicin fosfo-transferase II (NPTII), terminador NOS (N-t), promotor 35S de vírus de mosaico de couve-flor, β-glucoronidase (GUS), seqüência de margem direita de agrobactéria (RB), de margem esquerda (LB).

A Figura 2 é um mapa do vetor pBI121-E1 em entre seqüências de margem direita e esquerda usado na transformação de tabaco conforme reportado no Exemplo 1. A construção E1 contém o peptídeo de sinal VSPβ fundido ao terminal N do domínio catalítico E1. As seguintes seqüências são abreviadas; promotor NOS (N-p), neomicin fosfo-transferase II (NPTII), terminador NOS (N-t), promotor 35S de vírus de mosaico de couve-flor, β-glucoronidase (GUS), seqüência de margem direita de agrobactéria (RB), de margem esquerda (LB).

A Figura 3 mostra um mapa pGreen. A construção contém dois cassetes: (1) as seqüências de codificação de Arabidopse FLOWERING (FLC) reguladas pelo promotor CaMV 35S (35S), e sinal de polialdenilação de terminador de sintase napolina (nos), e (2) a região de codificação de fosfinotricin acetiltransferase (bar) do gene marcador selecionável de resistência herbicida regulado por promotor 35S e terminador nos.

A Tabela 1 apresenta a concentração de glicose (g/L) de tabaco transgênico e não-transgênico após cinco (5) dias de hidrólise. Estes resultados mostram que E1 tabaco pode auto-hidrolizar, e que celulose exógena é mais eficiente com E1 tabaco.

A Figura 4 é um gráfico mostrando produção de glicose de biomassa de tabaco (tipo selvagem) seca E1-FLC e W38 equilibrada em tampão citrato (pH 4,5) por 24 horas a 50°C, com ou sem Celulase AN, glucoamilase e hemicelulase adicionadas. As barras de erro indicam desvio padrão de ± 1 (n=3).

A Figura 5 é um gráfico mostrando a concentração de projeção de Pb (chumbo) e Zn (zinco) no tabaco não-transformado e E1-FLC transformado crescido em solo contaminado de Pb. Os resultados indicam de-

sempenho de fitoremediação comparável ao tabaco não-transformado e transformado.

A Figura 6 é um gráfico mostrando as concentrações de Ca (cálcio) e Fe (ferro) extraível de biomassa seca e moída incubada com tampão citrato pH 4,5 a 50°C com várias celulase adicionadas.

A Figura 7 é um gráfico mostrando os resultados de produção de glicose de E1 tabaco crescido em solo não-contaminado e contaminado com Pb na presença ou ausência de celulases exógenas. Os resultados mostram que a produção de glicose é inferior em E1 tabaco contendo aproximadamente 300 mg/kg de Pb, mas que este efeito desaparece quando celulases exógenas são adicionadas.

A Figura 8 apresenta duas fotografias ilustrando florescimento retardado e aumento de biomassa em tabaco FLC-transformado. A Figura 8(A) mostra uma planta transgênica FLC exibindo retardo no florescimento, tamanho de folha maior e mais curto, hábito de estudo conforme comparado a uma planta não-transformada de controle. A Figura 8(B) mostra anteras de planta não-transformada em maturidade completa e abrigo de pólen, e anteras ainda não maduras de plantas FLC.

A Tabela 2a mostra uma comparação de plantas de tabaco transgênicas de controle (não-transformadas) e T_0 E1-FLC com relação a retardo de florescimento e crescimento vegetativo antes do florescimento. Nota-se que cada linha é um genótipo heterozigoto separado, com efeitos de posição do gene FLC no genoma do tabaco criando variações no desempenho. A Tabela 2b mostra uma comparação do controle (não transformado) e de plantas de tabaco transgênicas E1-FLC T_0 em peso fresco e seco de biomassa, peso de mil sementes e, rendimento de semente por planta.

A Figura 9 mostra a pMZ766E1-cat, uma construção contendo o domínio catalítico Acidothermus cellulolyticus E1 acionado pelo promotor 35S, e a seqüência que codifica o peptídeo de sinal de proteína relacionada a patogênese de tabaco 1a(Pr1a) para objetivação de apoplasto da enzima E1. As abreviações usadas neste esquema são conforme segue: CaMV 35S: Promotor 35S de Vírus de Mosaico de Couve-flor; Ω: intensificador transla-

cional Ω de Vírus de Mosaico de Tabaco; Pr1a SP: a seqüência que codifica o peptídeo de sinal de proteína relacionada a patogênese de tabaco 1a(Pr1a); E1-cat: domínio catalítico da A. cellulolyticus E1; e nos: sinal de polialdenilação de napolina sintase.

A Figura 10 mostra a pDM302, uma construção contendo o gene marcador selecionável bar-herbicida controlado por promotor actin 1 de arroz e terminador nos. As abreviações usadas neste esquema são conforme segue: bar: seqüências de codificação de fosfinotricin acetil transferase(marcador/resistência a herbicida selecionáveis)/ nos: terminador de sintase napolina.

A Figura 11 mostra a pBY520, uma construção das seqüências de codificação de cevada Hva1 regulada por promotor actin 1 (ACt1) de arroz e terminador de inibidor de proteinase de batata II. Ela também contém o marcador selecionável de resistência à herbicida bar regulado por promotor 35S e terminador Nos. As abreviações usadas neste esquema são conforme segue: Act1-5': promotor 1 que age no arroz; Hval: seqüências de codificação de Proteína Leah de Cevada; PinII-3': terminador de inibidor de proteinase de batata; 35S-5': Promotor 35S de vírus de mosaico de couve-flor, bar: seqüências de codificação de fosfinotricin acetil transferase (marcador/resistência à herbicida selecionável); e nos: terminador de sintase napolina.

A Figura 12 mostra os resultados de análise de mancha Southern de DNA genômico de plantas de milho, sondada com o El-cat. A raia 1: 10 pg de fragmento Sac 1 E1 de pMZ766; Raias 2-3: controle de milho não-transformado (raia 2: DNA não-digerido e raia 3: DNA digerido); Raias 4-13: cinco tranformantes pMZ766 independentes; (raias 4, 6, 8, 10 e 12: DNA não digerido; raias 5, 7, 9, 11 e 13: DNA digerido com Sac). Tamanho de faixas é 1 kb.

A Figura 13 mostra manchas Western de milho transgênico conforme comparado a arroz transgênico e tabaco transgênico.

A Figura 14(A) é uma fotografia de tecido de folha de milho transgênica E1 obtido por microscopia de imagem microscópica de laser

confocal imunofluorescente usando o anticorpo primário E1 e um anticorpo secundário anti-camundongo FITC. Esta fotografia mostra que o tecido de folha transgêncica E1 exibe armazenamento aparente de E1 no apoplasto da planta. A Figura 14(B) é uma imagem de microscopia confocal de tecido de folha de uma folha de milho de controle não-transformada não mostrando expressão de enzima E1.

A Tabela 3 mostra atividade enzimática de E1 e percentagem de E1 em proteínas solúveis totais em milho T_0, tabaco T_4, e arroz T_0. As linhas de milho para cujos resultados são reportados nesta tabela são as mesmas conforme estudadas por western blot na Figura 13.

A Figura 15 mostra uma construção contendo a Cochliobolus carbonum endoxilanase/hemicelulase cDNA regulada pelo promotor 35S e intensificador. Esta construção contém as seqüências que codificam o peptídeo de sinal de proteína relacionada a patogênese de tabaco (Pr1a) para objetivação de XYL1 em apoplasto de tabaco. As abreviações usadas neste esquema são conforme segue: Promotor 35S de Vírus de Mosaico de Couve-flor; Ω: intensificador translacional de Vírus de Mosaico de Tabaco; e Pr1a SP: a seqüência que codifica do tabaco.

A Figura 16 mostra a atividade de celulase de extrato bruto de tabaco transgênico expressando E1. A carbóxi vermelha-metil-celulose na placa de Petri foi hidrolizada pela aplicação de extrato de E1 ou enzimas celulase comercialmente disponíveis (Celulase NA, BIO-CAT), para formar áreas claras. Nenhuma atividade de celulase foi observada a partir do extrato de tabaco tipo selvagem.

A Figura 17(a) mostra cromatogramas de grãos de milho incubados com El ou extrato de tabaco WT indicando várias moléculas de açúcar presentes na solução (vide Exemplo 6). Os picos são rotulados conforme segue: Glu: glicose; CB:celobiose. Existe um pequeno pico de celobiose na incubação de extrato de WT, mas nenhuma glicose. Ao invés, incubação com o extrato de WT produz um pico de carboidrato desconhecido. A Figura 17(b) é um gráfico mostrando concentrações de glicose de amostras de grão de milho em, ou um controle de tampão de citrato, extrato de tabaco E1, ou

extrato de tabaco tipo selvagem. As leituras de glicose foram tomadas em 0 e 24 horas após a adição dos extratos.

A Figura 18 mostra cromatograma IC ilustrando produção aumentada de xilose em plantas de tabaco transformadas com o gene E1. O tecido de planta de tabaco transformada com E1, ou tipo selvagem, foi incubado a 80°C por 2 horas em tampão de citrato (pH 5). A suspensão foi filtrada e analisada para açúcares solúveis. O extrato de concentração de xilose (um componente de hemicelulose) de plantas E1 foi substancialmente mais alto (14,8 g/kg) do que as concentrações de xilose no extrato tipo selvagem (3 g/kg).

A Figura 19 é um gráfico ilustrando a produção aumentada de glicose de hidrólise de biomassa de tabaco transgênico expressando a E1 endonuclease comparada a biomassa tipo selvagem. Os níveis de glicose foram medidos de amostras de E1 e tipo selvagem (vide Exemplo 7) antes e após tratamento de AFEX (explosão de fibra de amônia).

A Figura 20 mostra duas fotografias que permitem a visualização de E1 hidrólise de CMC (carbóxi-metil-celulose) usando corante Congo Red. As pontas da folha de tabaco não-transformada (esquerda) e transgênica E1 (direita (A) antes e (B) após incubação a 65°C por trinta minutos, e manchadas com Congo Red.

Definições

Através de todo o relatório descritivo, vários termos são empregados, que são definidos nos parágrafos seguintes.

Conforme aqui usado, o termo "construção de ácido nucléico" se refere a um polinucleotídeo ou oligonucleotídeo compreendendo seqüências de ácido nucléico não normalmente associadas na natureza. Uma construção de ácido nucléico da presente invenção é preparada, isolada, ou manipulada pela mão do homem. Os termos "ácido nucléico", "polinucleotídeo", e "oligonucleotídeo" são usados aqui permutavelmente, e se referem a um polímero de deoxiribonucleotídeo (DNA) ou ribonucleotídeo (RNA), ou na forma simples ou trançada dupla. Para a proposta da presente invenção, este termos não são para serem construídos como limitados com relação ao

comprimento do polímero, e devem também ser compreendidos para envolverem análogos de polímeros de DNA ou RNA produzidos de análogos de nucleotídeos naturais e/ou de nucleotídeos que são modificados na base, açúcar, e/ou porções de fosfato.

Conforme aqui usado, o termo "gene" se refere a uma seqüência de ácido nucléico discreta para um produto celular discreto, e/ou realização de uma ou mais funções intracelular ou extracelular. Mais especificamente, o termo "gene" se refere a um ácido nucléico que inclui uma porção que codifica uma proteína e, opcionalmente, envolve seqüências regulatórias, tais como promotores, intensificadores, terminadores, e similares, que são envolvidos na regulação de expressão da proteína codificada pelo gene de interesse. O gene e seqüências regulatórias podem ser derivados a partir da mesma fonte natural, ou podem ser heterólogos um ao outro. A definição pode também incluir ácidos nucléicos que não codificam proteínas, mas, preferivelmente, proporcionam gabaritos para transcrição de moléculas de RNA funcionais, tais como tRNAs, rRNAs, etc. Alternativamente, um gene pode definir uma locação genômica para um evento-função particular, tal como a ligação de proteínas e/ou ácidos nucléicos.

Conforme aqui usado, o termo "expressão de gene" se refere a conversão da informação, contida em um gene, em um produto de gene. Um produto de gene pode ser o produto transcricional direto de um gene (por exemplo, mRNA, tRNA, rRNA, RNA de anti-sentido, RNA estrutural de ribozina, ou qualquer outro tipo de RNA), ou uma proteína produzida por translação de um mRNA. Os produtos de gene também incluem RNAs que são modificados por processos, tais como capeamento, polialdenilação, metilação, e edição, proteínas pós-translacionalmente modificadas, e proteínas modificadas por, por exemplo, metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, ADP-ribosilação, miristilação, e glicosilação.

Conforme aqui usado, o termo "operavelmente ligado" se refere a um relacionamento entre duas seqüências de ácido nucléico nas quais a expressão de uma das seqüências de ácido nucléico é controlada por, regulada por, ou modulada por outra seqüência de ácido nucléico. Preferivelmen-

te, uma seqüência de ácido nucléico que é operavelmente ligada a uma segunda seqüência de ácido nucléico é covalentemente ligada, ou diretamente ou indiretamente, a tal segunda seqüência, embora qualquer associação tridimensional efetiva seja aceitável. Uma seqüência de ácido nucléico simples pode ser operavelmente ligada a múltiplas outras seqüências. Por exemplo, um promotor simples pode direcionar transcrição de espécies múltiplas de RNA.

Conforme aqui usado, os termos "promotor" e "elemento promotor" se referem a um polinucleotídeo que regula expressão de uma seqüência de polinucleotídeo selecionada operavelmente ligada ao promotor, e que efetua expressão da seqüência de polinucleotídeo selecionada em células. O termo "promotor de planta", conforme aqui usado, se refere a um promotor que funciona em uma planta. Promotores constitutivos, bem como promotores específicos de tecido, que funcionam seletivamente em uma parte de um corpo de planta, incluindo uma flor, são preferíveis. Exemplos de promotores de planta incluem, mas não estão limitados a, Promotor 35S de vírus de mosaico de couve-flor (CaMV) e promotor de sintase napolina de Agrobactéria tumefaciens.

O termo "transgene", conforme aqui usado, se refere a um gene exógeno que, quando introduzido em uma célula hospedeira através da mão do homem, por exemplo, usando-se um processo tal como transformação, eletroporação, bombardeio de partícula, e similares, é expresso pela célula hospedeira, e integrado no DNA da célula tal que o traço ou traços produzidos pela expressão do transgene é herdado pela progenia da célula transformada. Um transgene pode ser parcialmente ou inteiramente heterólogo (isto é, estranho à célula na qual ele é introduzido). Alternativamente, um transgene pode ser homólogo a um gene endógeno da célula na qual ele é introduzido, mas é designado para ser inserido (ou é inserido) no genoma da célula de tal modo a alterar o genoma da célula (por exemplo, é inserido em uma locação que difere daquela do gene natural ou sua inserção resulta em um golpe decisivo). Um transgene pode estar presente em uma célula na forma de um episssoma. Um transgene pode incluir uma ou mais seqüências

regulatórias transcricionais e outros ácidos nucléicos, tais como introns. Alternativamente ou adicionalmente, um transgene é um que não é naturalmente associado com as seqüências de vetor que é associada de acordo com a presente invenção.

Conforme será claro do contexto, o termo "planta", conforme aqui usado, pode se referir a uma planta total, parte de planta (por exemplo, cortes, tubérculos, pólen), órgãos de planta (por exemplo, folhas, caules, flores, raízes, frutos, ramos, etc), células de planta individuais, grupos de células de planta (por exemplo, células de planta cultivadas), protoplastos, extratos de planta, sementes, e progenia destes. A classe de plantas que pode ser usada nos métodos da presente invenção é tão ampla quanto a classe de plantas mais altas acessíveis à técnicas de transformação, incluindo ambas plantas monocotiledônea e dicotiledônia, bem como certas plantas inferiores, tais como algas. O termo inclui plantas de uma variedade de níveis plóides, incluindo poliplóide, diplóide e haplóide. Em certas concretizações da invenção, as plantas são plantas de campo verdes. Em outras concretizações, as plantas são crescidas especificamente para "energia de biomassa". Por exemplo, plantas adequadas incluem, mas não estão limitadas a, milho, grama, sorgo, "miscanthus", cana de açúcar, álamo, pinho, trigo, soja, algodão, cevada, grama de relvado, tabaco, bambu, colza, açúcar, beterraba, girassol, salgueiro, e eucalipto. Usando-se métodos de transformação, plantas geneticamente modificadas, células de planta, tecidos de planta, sementes, e similares, podem ser obtidas.

Conforme aqui usado, o termo "protoplasto" se refere a uma célula de planta isolada sem paredes celulares que tem a potência de regeneração na cultura de célula, ou uma planta total.

Conforme aqui usado, o termo "transformação" se refere a um processo pelo qual uma molécula de ácido nucléico exógena (por exemplo, um vetor ou molécula de DNA recombinante) é introduzida em uma célula recipiente, calo ou protoplasto. A molécula de ácido nucléico exógena pode ou não pode estar integrada em (isto é, covalentemente ligada a) DNA cromossomal que compõe o genoma da célula hospedeira, calo ou protoplasto.

Por exemplo, o polinucleotídeo exógeno pode ser mantido em um elemento epissomal, tal como um plasmídeo. Alternativamente, o polinucleotídeo exógeno pode tornar-se integrado em um cromossoma de modo que ele é herdado pelas células filhas através da replicação de cromossomo. Métodos para transformação incluem, mas não estão limitados a, eletroporação, magnetoporação, tratamento de Ca^{+2}, injeção, bombardeio de partícula, infecção retroviral, e lipofecção.

Conforme aqui usado, o termo "estavelmente transformada", quando aplicado a uma célula de planta, calo ou protoplasto, se refere a uma célula, calo ou protoplasto no qual uma molécula de ácido nucléico exógena inserida é capaz de replicação, ou como um plasmídeo de replicação autônomo, ou como parte do cromossomo hospedeiro. A estabilidade é demonstrada pela capacidade das células transformadas estabelecerem linhas de célula ou clones compreendidos de uma população de células filhas contendo a molécula de ácido nucléico exógena.

Os termos "geneticamente modificado" e "transgênico" são usados aqui permutavelmente. Um organismo transgênico ou geneticamente modificado é um que tem um antecedente genético que é pelo menos parcialmente devido a manipulação pela mão do homem através do uso de engenharia genética. Por exemplo, o termo "célula transgênica", conforme aqui usado, se refere a uma célula cujo DNA contém um ácido nucléico exógeno não originalmente presente na célula não-transgênica. Uma célula transgênica pode ser derivada ou regenerada de uma célula transformada ou derivada de uma célula transgênica. Células transgênicas exemplares, no contexto da presente invenção, incluem planta "calli", derivada de uma célula de planta estavelmente transformada (tais como folha, raiz, caule, ou células reprodutivas), obtidas de uma planta transgênica. Uma "planta transgênica" é qualquer planta em que uma ou mais das células da planta contêm seqüências de ácido nucléico heterólogas introduzidas por meio de intervenção humana. As plantas transgênicass expressam tipicamente seqüências de DNA, que conferem as plantas com caracteres diferentes daquela de plantas não-transgênicas nativas da mesma cepa. A progenia de tal planta ou de

cruzamentos envolvendo tal planta na forma de plantas, sementes, culturas de tecido e tecido isolado e células, que conduzem pelo menos parte da modificação originalmente introduzida pela engenharia genética, são compreendidos pela definição.

Conforme aqui usado, o termo "regeneração" se refere ao processo de crescimento de uma planta de uma célula de planta (por exemplo, protoplasto de planta, calo de planta, ou explante de planta).

Descrição Detalhada de Certas Concretizações Preferidas

Conforme mencionado acima, a presente invenção se refere a sistemas aperfeiçoados e estratégias para redução de custos e aumento de rendimentos de produção de etanol de biomassa lignocelulósica.

I. Enzimas Lignocelulolíticas

Em um aspecto, a presente invenção proporciona plantas projetadas (isto é, geneticamente transformadas) para produzir uma ou mais enzimas lignocelulolíticas. Enzimas lignocelulolíticas adequadas incluem enzimas que são envolvidas no rompimento e/ou degradação de lignocelulose. A biomassa lignocelulósica é um substrato complexo em que celulose cristalina é embutida dentro de uma matriz de hemicelulose e lignina. A lignocelulose representa aproximadamente 90% do peso seco de muito material de planta com celulose compondo entre 30% a 50% do peso seco de lignocelulose, e hemicelulose compondo entre 20% e 50% do peso seco de lignocelulose.

O rompimento e degradação (por exemplo, hidrólise) de lignocelulose por enzimas lignocelulolíticas conduzem à formação de substâncias incluindo monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos e fenóis. Enzimas lignocelulolíticas incluem, mas não estão limitadas a, celulases, hemicelulases e ligninases.

A- Celulases

As celulases são enzimas envolvidas na degradação de celulose. As enzimas celulases são classificadas na base de seu modo de ação. Existem dois tipo básicos de celulases: as endocelulases, que clivam as cadeias de polímero internamente; e as exocelulases, que clivam a partir das

extremidades de redução e não-redução de moléculas geradas pela ação de endocelulases. As celulases incluem celobiohidrolases, endoglucanases, e β-D-glicosidases. As endoglucanases atacam aleatoriamente as regiões amorfas de substrato de celulose, produzindo principalmente oligômeros mais altos. As celulobiohidrolases são exocelulases que hidrolizam celulose cristalina e liberam celobiose (dímero de glicose). Ambos os tipos de enzimas hidrolizam ligações β-1,4-glicosídicas. As β-D-glicosidases ou celulobiase convertem oligossacarídeos e celubiose em glicose.

De acordo com a presente invenção, as plantas podem ser projetadas para compreenderem um gene que codifica uma enzima celulase. Alternativamente, as plantas podem ser projetadas para compreenderem mais do que um gene que codifica uma enzima celulase. Por exemplo, as plantas podem ser projetadas para compreenderem um ou mais genes que codificam uma celulase da classe celulobiohidrolase, um ou mais genes que codificam uma celulase da classe endoglucanase, e/ou um ou mais genes que codificam uma celulase da classe β-D-glicosidase.

Exemplos de genes endoglucanase que podem ser usados na presente invenção podem ser obtidos de Aspergillus aculeatus (Patente dos Estados Unidos N° 6.623.949; WO 94/14953), Aspergillus kawachii (Patente dos Estados Unidos N° 6.623.949), Aspergillus aryzae (Kimanoto et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996, 46: 538-544; Patente dos Estados Unidos N° 6.635.465), Aspergillus nidulans (Lockington et al., Fungal Genet. Biol., 2002, 37: 190-196), Cellulomonas fimi (Wong et al., Gene, 1986, 44:315-324), Bacillus subtilis (MacKay et al., Nucleic Acids Res., 1986, 14: 9159-9170), Cellulomonas pachnodae (Cazemier et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 232-239), Fusarium aquiseti (Goedegebuur et al., Curr. Genet., 2002, 41:89-98), Fusarium axysporum (Hagen et al., Gene, 1994, 150: 163-167; Sheppard et al., Gene, 1994, 150: 163-167), Humicola insolens (Patente dos Estados Unidos N° 5.912.157; Davies et al., Biochem J., 2000, 348: 201-207), Hypocrea jecorina (Penttila et al., Gene, 1986, 45: 253-263), Humicola grisea (Goedegebuur et al., Curr. Genet., 2002, 41: 89-98), Micromonospora cellulolyticum (Lin et al., J. Ind. Microbiol, 1994, 13: 344-350),

Myceliophthora thermophila (Patente dos Estados Unidos N°5.912.157), Rhizopus oryzae (Moriya et al., J. Bacteriol., 2003, 185: 1749-1756), trichoderma reesi (saloheimo et al., Mol. Microbiol., 1994, 13: 219-228), e Trichoderma viridae (Kwon et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63: 1714-1720; Goedegebuur et al., Curr. Genet., 2002, 41: 89-98).

Em certas concretizações, as plantas são projetadas para compreenderem o gene endo-1,4-β-glucanase E1 (Acesso no Banco de Genes N° U33212). Este gene foi isolado a partir do bactéria termofílico Acidothermus cellulolyticus. Acidothermus cellulolyticus foi caracterizado com a capacidade de hidrolizar e degradar celulose de plantas. O complexo de celulase produzido por A. cellulolyticus é conhecido por conter várias enzimas celulase termoestáveis diferentes com atividades máximas a temperaturas de 75°C a 83°C. Estas celulases são resistentes a inibição de celobiose, um produto final das reações catalisadas por endo- e exo-celulases.

A E1 endo-1,4-β-glucanase é descrita em detalhes na Patente dos Estados Unidos N° 5.275.944. Esta endonuclease demonstra uma temperatura ótima de 83°C, e uma atividade específica de 40 µmol de liberação de glicose de proteína carboximetilcelulose/min/mg. Esta E1 endonuclease foi adicionalmente identificada como tendo um pH isoelétrico de 6,7, e um peso molecular de 81.000 daltons por eletroforese de gel de poliacrilamida SDS. Ela é sintetizada como um precursor com um peptídeo de sinal que se dirige a trajetória externa na bactéria. A enzima madura é de 521 aminoácidos (aa) de comprimento. A estrutura de cristal do domínio catalítico de cerca de 40 kDA (358 aa) foi descrita (J. Sakon et al., Biochem., 1996, 35: 10648-10660). Seu articulador rico em pro/thr/ser é 60 aa, e o domínio de ligação de celulose (CBD) é 104 aa. As propriedades do domínio de ligação de celulose que conferem sua função não são bem caracterizadas. A expressão da planta de gene E1 foi reportada (vide, por exemplo, M. T. Ziegler et al., Mol. Breeding, 2000, 6: 37-46; Z. Dai et al., Mol. Breeding, 2000, 6: 277-285; Z. Dai et al., Transg. Res., 2000, 9: 43-54; e T. Ziegelhoffer et al., Mol. Breeding, 2001, 8: 147-158).

Exemplos de genes de celobiohidrolase que podem ser usados

na presente invenção podem ser obtidos de Acidothermus cellulolytics, Acremonium cellulolytics (Patente dos Estados Unidos N° 6.127.160), Agaricus bisporus (Chow et al., Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60: 2779-2785), Aspergillus aculeatus (Takada et al., J. Ferment. Bioeng., 1998, 85:1-9), Aspergillus niger (Gielkens et al., Appl. Environ. Microbiol., 65: 1999, 4340-4345), Aspergillus oryzae (Kitamoto et al., Appll. Microbiol. Biotechnol., 1996, 46: 538-544), Athelia rolfsii (EMBL N° de acesso AB103461), Chaetomium thermophilium (EMBL N°s de acesso AX657571 e CQ838150), Cullulomonas fimi (Meinke et al., Mol. Microbiol., 1994, 12:413-422), Emericella nidulans (Lockington et al., Fungal Genet. Biol., 2002, 37: 190-196), Fusarium oxysporum (Hagen et al., Gene, 1994, 150: 163-167), Geotrichum sp. 128 (EMBL N° de aceso AB089343), Humicola grisea (de Oliviera e Radford, Nucleic Acids Res., 1990, 18: 668; Takashima et al., J. Biochem., 1998, 124:717-725), Humicola nigrescens (EMBL N° de acesso AX657571), Hypocrea koningii (Teeri et al., Gene, 1987, 51: 43-52), Mycelioptera thermophila (EMBL N° de acesso AX657599), Neocallimastix patriciarum (Denman et al., Appl. Environ. Microbiol., 1996, 62: 1889-1896), Phanerochaete chryssosporium (Tempelaars et al., Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60: 4387-4393), Thermobifida fusca (Zhang, Biochemistry, 1995, 34: 3386-3395), Trichoderma reesi (Terri et al., BioTechnology, 1983, 1: 696-699; Chen et al., BioTechnology, 1987, 5: 274-278), e Trichoderma viride (EMBL N°s de acesso A4368686 e A4368688).

Exemplos de genes β-D-glucosidase que podem ser usados na presente invenção podem ser obtidos de Aspergillus aculeatus (Kawaguchi et al., Gene, 1996, 173: 287-288), Aspergillus kawachi (Iwashita et al., Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65: 5546-5553), Aspergillus oryzae (WO 2002/095014), Cellulomonas biazotea (Wong et al., Gene, 1998, 207: 79-86), Penicillum funiculosum (WO 2004478919), Saccharomycopsis fibuligera (Machida et al., Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54: 3147-5155), Schizosaccharomyces pombe (Wood et al., Nature, 2002, 415: 871-880), e Trichoderma reesei (Barnett et al., BioTechnology, 1991, 9: 562-567).

A expressão de transgene de celulases em plantas para a con-

versão de celulose em glicose foi reportada (vide, por exemplo, Y. Jin Cai et al., Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65: 553-559; C. R. Sanchez et al., Revista de Microbiologica, 1999, 30: 310-314; R. Cohen et al., Appl. Environ., 2995, 71: 2412-2417; Z. Dai et al., Transg. Res., 2005, 14:627-543).

B- Hemicelulases

As hemicelulases são enzimas que são envolvidas na degradação de hemicelulose. As hemicelulases incluem xilanases, arabinofuranosidases, acetil xilan esterases, glucoronidases, mannanses, galactanases, e arabinases. Similares a enzimas celulase, as hemicelulases são classificadas na base de seu modo de ação: as hemicelulases de endo-ação atacam as ligações internas dentro da cadeia de polissacarídeo; as hemicelulases de endo-ação agem progressivamente de, ou reduzir ou não-reduzir, a extremidade das cadeias de polissacarídeos.

De acordo com a presente invenção, as plantas podem ser projetadas para compreenderem um gene que codifica uma enzima hemicelulase. Alternativamente, as plantas podem ser projetadas para compreenderem mais do que um gene que codifica uma enzima hemicelulase. Por exemplo, as plantas podem ser projetadas para compreenderem um ou mais genes que codificam uma hemicelulase da classe xilanase, um ou mais genes que codificam uma hemicelulase da classe arabinofuranosidase, um ou mais genes que codificam uma hemicelulase da classe acetil xilan esterase, um ou mais genes que codificam uma hemicelulase da classe glucuronidase, um ou mais genes que codificam uma hemicelulase da classe mannase, um ou mais genes que codificam uma hemicelulase da classe galactanase, e/ou um ou mais genes que codificam uma hemicelulase da classe arabinase.

Exemplos de hemicelulases de endo-ação incluem endoarabinanase, endoarabinogalactanase, endoglucanase, endomannanase, endoxilanase, e feraxan endoxilanase. Exemplos de hemicelulases de exo-ação incluem α-L-arabinosidase, β-L-arabinosidase, α-1,2-fucosidade, α-D-galactosidase, β-D-galactosidase, β-D-glucosidase, β-D-glucuronidase, β-D-mannosidase, β-D-xilosidase, exo-glicosidase, exo-celobiohidrolase, exo-mannobiohidrolase, exo-mannanase, exo-xilanase, xilan α-glucuronidase, e

coniferin β-glucosidase.

Os genes de hemicelulase podem ser obtidos de qualquer fonte adequada, incluindo organismos fungais e bacteriais, tais como Aspergillus, Disporotrichum, Penicillium, Neurospora, Fusarium, Trichoderma, Humicola, Thermomyces, e Bacillus. Exemplos de hemicelulases que podem ser usadas na presente invenção podem ser obtidos de Acidothermus cellulolytics, Acidobactéria capsulatum (Inagaki et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998, 62: 1061-1067), Agaricus bisporus (De Groot et al., J. Mol. Biol., 1998, 277:273-284), Aspergillus aculeatus (Patente dos Estados Unidos N° 5.693.518), Aspergillus kawachii (Ito et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 1992, 56: 906-912), Aspergillus niger (EMBL N° de acesso AF108944), Magnaprthe grisea (Wu et al., Mol. Plant Microbe Interact., 1995, 8: 506-514), Penicillium chrysogenum (Haas et al., gene, 1993, 126: 237-242), Talaromyces amersonii (WO 02/24926), e Trichoderma reesei (EMBL N°s de acesso X69573, X69574 e AY281369).

Em certas concretizações, as plantas são projetadas para compreenderem a Cochlibolus carbonum endoxilanase (XYL1) (P. C. Apele et al., Mol. Plant Microbe Inteact., 1993, 6:467-473) (vide a seção de Exemplo).

C- Ligninases

As ligninases são enzimas que são envolvidas na degradação de lignina. Enzimas de degradação de lignina incluem, mas não estão limitadas a, lignina peroxidase, peroxidases dependentes de manganês, peroxidases híbridas (que exibem propriedades combinadas de lignina peroxidases e peroxidases dependentes de manganês), e laccases. Peróxido de hidrogênio, requerido como co-substrato pelas peroxidases, pode ser gerado por glicose oxidase, aril álcool oxidase, e/ou glioxal oxidase ativada por lignina peroxidase.

De acordo com a presente invenção, as plantas podem ser projetadas para compreenderem um gene que codifica uma enzima ligninase. Alternativamente, plantas podem ser projetadas para compreenderem mais de um gene que codifica uma enzima ligninase, por exemplo, plantas podem ser projetadas para compreender um ou mais genes que codificam uma lig-

ninase da classe lignina peroxidase, um ou mais genes que codificam uma ligninase da classe peroxidase dependente de manganês, um ou mais genes que codificam uma ligninase da classe peroxidase híbrida, e/ou um ou mais genes que codificam uma ligninase da classe laccase.

Os genes de degradação de lignina podem ser obtidos de Acidothermus cellulolyticus, Bjerkandera adusta, Ceriporiopsis subvermispora (vide WO 02/079400), Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chryssosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, ou Trichoderma viride.

Exemplos de genes que codificam ligninases que podem ser usados na invenção podem ser obtidos de Bjerkandera adusta (WO 2001/098469), Ceriporiopsis subvermispora (Conesa et al., J. Biotechnol., 2002, 93: 143-158), Cantharellus cibariusi (Ng et al., Biochem., e Biophys. Res. Comm., 2004, 313: 37-41), Coprinus cinereus (WO 97/008325; Conesa et al., J. Biotechnol., 2002, 93: 143-158), Lentinula edodes (Nagai et al., Applied Microbiol. A Biotechnol., 2002, 60: 327-335, 2002), Melacocarpus albamyces (Kiiskinen et al., FEBS Letters, 2004, 576: 251-255, 2004), Myceliophthora thermophila (WO 95/006815), Phanerochaete chrysosporium (Conesa et al., J. Biotechnol., 2002, 93: 143-158; Martinez, Enz, Microb. Technol, 2002, 30: 425-444), Phlebia radiata (Conesa et al., J; Biotechnol., 2002, 93: 143-158), Pleurotus eryngii (Conesa et al., J. Biotechnol., 2002, 93: 143-158), Polyporus pinsitus (WO 96/000290), Rigidoporus lignosus (Garavaglia et al., J. of Mol. Biol., 2004, 342: 1519-1531), Rhizoctonia solani (WO 96/007988), Scytalidium thermophilum (WO 95/033837), Tricholoma giganteum (Wang et al., Biochem., Biophys. Res. Comm., 2004, 315: 450-454), e Trametes versicolor (Conesa et al., J. Biotechnol., 2002, 93: 143-158).

Por exemplo, as plantas podem ser projetadas para compreenderem uma ou mais lignina peroxidases. Genes que codificam lignina peroxidases podem ser obtidos de Phanerochaete chrysosporium ou Phlebia ra-

diata. As lignina-peroxidases são proteínas heme glicosilatadas (MW 38 a 46 kDa) que são dependentes do peróxido de hidrogênio para atividade e catalisam a clivagem oxidativa de polímero de lignina. Pelo menos seis (6) proteínas heme (H1, H2, H6, H7, H8 e H10) com atividade de lignina peroxidase foram identificadas Phanerochaete chrysosporium na cepa BKMF-1767. Em certas concretizações, as plantas são projetadas para compreenderem a Phanerochaete chrysosporium ligninase filamentosa de raiz branca (CGL5) (H. A. de Boer et al., Gene, 1988, 69(2) (vide a seção de Exemplos).

D- Outras Enzimas Lignocelulolítica

Em adição às celulases, hemicelulases e ligninases, enzimas ligninocelulolítica que podem ser usadas na prática da presente invenção também incluem enzimas que degradam substâncias pécticas. Substâncias pécticas são compostas de homogalacturonan (ou pectin), rhamnogalacturonan, e xilogalacturonan. Enzimas que degradam homogalacturonan incluem pectato liase, pectin liase, poligalacturonase, pectin acetil esterase, e pectin metil esterase. Enzimas que degradam rhamnogalacturonan incluem alfa-arabinoduranosidase, beta-galactosidade, galactanase, arabinanase, alfa-arabinofuranosidade, rhamnogalacturonase, rhamnogalacturonan, liase, e rhamnogalacturonan acetil esterase. Enzimas que degradam xilogalacturonan incluem xilogalacturonosidade, xilogalacturonase, e rhamanogalacturonan liase. Outras enzimas que podem intensificar ou promover rompimento e/ou degradação de lignocelulose incluem, mas não estão limitadas a, amilases (por exemplo, alfa-amilase e glucoamilase), esterases, lípases, fosfolipases, fitases, proreases, e peroxidases.

E- Combinação de Enzimas Lignocelulolíticas

De acordo com a presente invenção, as plantas podem ser projetadas para compreenderem um gene que codifica uma enzima lignocelulolítica, por exemplo, enzima celulase, uma enzima hemicelulase, ou uma enzima ligninase. Alternativamente, as plantas podem ser projetadas para compreenderem dois ou mais genes que codificam enzimas lignocelulolíticas, por exemplo, enzimas de classes diferentes de celulases, enzimas de classes diferentes de hemicelulases, enzimas de classes diferentes de ligni-

nases, ou combinações destas. Por exemplo, combinações de genes podem ser selecionadas para proporcionar degradação eficiente de um componente de lignocelulose (por exemplo, celulose, hemicelulose, ou lignina. Alternativamente, combinações de genes podem ser selecionadas para proporcionar degradação eficiente do material lignocelulósico.

Em certas concretizações, os genes são otimizados para o substrato (por exemplo, celulose, hemicelulase, lignina ou material lignocelulósico total) em uma planta particular (por exemplo, milho, tabaco, grama). O tecido de uma espécie de planta é do mesmo modo para ser fisicamente e/ou quimicamente diferente do tecido de outra espécie de planta. A seleção de genes ou combinação de genes para alcançar degradação eficiente de um dado tecido de planta está dentro das habilidades do versado na técnica.

Em algumas concretizações, as combinações de genes são selecionadas para proporcionar atividade de enzimas sinergísticas (isto é, genes são selecionados tais que a interação entre enzimas ou atividades de enzima distinguíveis resultam na atividade total das enzimas tomadas juntas sendo maior do que a soma dos efeitos das atividades individuais).

Atividade lignocelulotítica eficiente pode ser alcançada pela produção de duas ou mais enzimas em uma planta transgênica simples. Conforme mencionado acima, as plantas podem ser transformadas para expressarem mais do que uma enzima, por exemplo, pelo emprego do uso de construções de gene múltiplas que codificam cada uma das enzimas selecionadas, ou uma construção simples compreendendo seqüências de nucleotídeo múltiplas que codificam cada uma das enzimas selecionadas. Alternativamente, as plantas transgênicass individuais, cada uma estavelmente transformada para expressar uma dada enzima, podem ser cruzadas por métodos conhecidos na técnica (por exemplo, polinização, esterilidade macho citoplasmática, e similares), para obter uma planta resultante que produz todas as enzimas das plantas de partida individuais.

Alternativamente, a atividade lignocelulolítica pode ser alcançada pela produção de duas ou mais enzimas lignocelulolíticas em plantas separadas. Por exemplo, três linhas separadas de plantas (por exemplo, mi-

lho), uma expressando uma ou mais enzimas da classe celulase, outra expressando uma ou mais enzimas da classe hemicelulase, e a terceira expressando uma ou mais enzimas da classe ligninase, podem ser desenvolvidas e crescidas simultaneamente. A "mistura" desejada de enzimas produzida pode ser alcançada simplesmente pela mudança da razão de semente, levando-se em consideração o clima da fazenda e tipo de solo, que são esperados influenciarem os rendimentos de enzima nas plantas.

Outras vantagens desta aproximação incluem, mas não estão limitadas a, saúde aumentada da planta (que é conhecida para ser adversamente afetada a medida que o número de genes introduzidos aumenta), produções de transformações mais simples, e maior flexibilidade na incorporação dos traços desejados em variedades de planta comerciais para produção em grande escala.

F- Métodos de Identificação de Enzimas Celulase Microbiais que podem Funcionar nas Plantas

Atualmente, é um processo prolongado e de trabalho intensivo determinar se uma enzima microbial pode ser funcionalmente expressa em plantas através de técnicas de DNA recombinante. As plantas transgênicass estáveis têm que ser geradas e caracterizadas, em seguida as enzimas têm que ser extraídas a partir da biomassa, e testadas in vitro. A presente invenção proporciona métodos de classificação para a identificação rápida de enzimas celulase microbiais que podem funcionar em plantas. Em certas concretizações, métodos de classificação da presente invenção permitem avaliação da atividade de enzima em tecidos de planta em uma questão de dias ou horas, preferivelmente do que semanas.

Mais especificamente, os métodos de classificação são providos aqui que usam tecidos de planta transientemente transformados para expressar o transgene de um gene de interesse, e avaliar a atividade enzimática de celulase. Expresso transiente de transgenes em tecidos de plantas reduz o tempo necessário para produzir enzimas de meses a dias. Uma concretização dos métodos de classificação da invenção é descrita no Exemplo 9. Neste método de classificação, folhas de tabaco são usadas. O

bactéria de solo Agrobacteruim tumefaciens pode ser usado para transferir o gene de interesse contido em um vetor de transformação de planta padrão nas células de tabaco por infiltração da bactéria na folha (Cazzanelli and Velten, Planta, 2006, 224: 582-597). Três a cinco dias mais tarde o tecido infiltrado expressa o transgene em níveis suficientes para analisar a atividade enzimática.

A atividade enzimática de celulase pode ser analisada usando-se qualquer método adequado. Conforme descrito no Exemplo 9, a atividade enzimática pode ser avaliada usando-se carbóxi-metil-celulose (CMC). AS enzimas celulase podem rapidamente hidrolizar as ligações 1,4-glucan que ligam moléculas de glucan juntas na celulose. CMC pode ser manchada com o corante Congo Red; contudo, quando hidrolisada por enzimas celulase, tais como E1 endonuclease de Acidothermus cellulolytics, CMC não é mais reativa a Congo Red. CMC pode ser usada com ágar para formar um meio sólido que pode ser derramado em placas de Petri para formar placas de CMC (M. Ziegler et al., Molecular Breeding, 200, 6: 37-46; T. Teather et al., App. & Env. Microbiology, 1982, 43: 777-780). Plantas transgênicass que expressam o gene de interesse podem ser colocadas diretamente na superfície das placas de CMC, e permitidas incubarem. Após incubação e remoção da biomassa de planta, a placa de CMC é inundada com Congo Red para manchar a celulose no meio. A ausência de manchamento por Congo Red na placa (isto é, hidrólise de CMC) é indicativa de atividade enzimática celular do transgene.

G- Métodos de Otimização de Códon de Seqüências de Gene para Expressão Aumentada de Enzimas Celulase Microbiais em Plantas

Para expressão otimizada de enzimas microbiais em plantas, mudanças preferenciais nas seqüências de códon são importantes. A presente invenção proporciona um método para modificar seqüências de gene para expressão aumentada de celulases microbiais em plantas. O método da invenção compreende a construção de uma tabela de uso de códon composta pelo cálculo da média do uso de códon de pelo menos duas plantas diferentes de genomas seqüenciados conhecidos. A tabela de uso de códon

composta é, em seguida, usada como um gabarito para modificar a seqüência de polinucleotídeo de uma seqüência de gene de polinucleotídeo microbial que codifica uma enzima lignocelulolítica. Este método permite a geração de seqüências de polinucleotídeo que são melhores adequadas para expressão de enzimas microbiais em plantas.

No método da invenção, o cálculo da média pode ser realizado usando-se o uso de códon de duas, três, quatro, ou mais plantas diferentes. Conforme será reconhecido por um versado na técnica, o método da invenção pode ser realizado usando-se informação de uso de códon de qualquer número de plantas, e de qualquer combinação de plantas. Em certas concretizações, as plantas são selecionadas tal que pelo menos uma é uma planta monocot e pelo menos uma é uma planta dicot. Em certas concretizações, as plantas são selecionadas baseados na proposta pretendida do polinucleotídeo (por exemplo, uma seqüência de gene microbial a ser usada para expressão em milho e tabaco será preferivelmente otimizada de códon usando uma tabela de uso de códon composta construída pelo cálculo da média do uso de códon de Zea mays, e Nicotiana tabacum.

Também providas aqui são seqüências de polinucleotídeo isoladas que foram otimizadas de códon de acordo com o método da invenção, bem como células de planta, partes de planta e plantas que foram transformadas usando-se estes polinucleotídeos otimizados de códon.

Uma concretização do método da invenção é descrita no Exemplo 8, onde uma tabela de uso de códon composta foi construída pelo cálculo da média dos usos de códon de Zea mays, Arabidopsis thaliana, e Nicotiana tabacum. Usando-se este método, três polinucleotídeos otimizados de códon foram gerados (vide Exemplo 8): uma seqüência de polinucleotídeo que codifica E1 endoglucanase, que compreende SEQ ID NO:1; uma seqüência de polinucleotídeo que codifica família de 48 glicoside hidrolase, que compreende SEQ ID NO:2; e uma seqüência de polinucleotídeo que codifica família de 10 glicoside hidrolase, que compreende SEQ ID NO:3.

H- Outras Propriedades

Em certas concretizações, as plantas são projetadas para ex-

pressar uma enzima lignocelulolítica (por exemplo, um celulase, uma hemicelulase, ou uma ligninase) em um nível maior do que 0,5% de proteína solúvel total (TSP). Em outras concretizações, as plantas são projetadas para expressar uma enzima lignocelulolítica em um nível maior do que 5% de TSP. Em ainda outras concretizações, as plantas são projetadas para expressar uma enzima lignocelulolítica em um nível maior do que 10% de TSP. Em ainda outras concretizações, as plantas são projetadas para expressar uma enzima lignocelulolítica em um nível maior do que 20% de TSP. Altos níveis de produção de enzima conduzirão a degradação de material de lignocelulose mais completa, particularmente quando usados em uma "mistura" de variedades de plantas transgênicas, conforme descrito acima, onde cada variedade produz uma enzima que hidrolisará lignocelulose alvo de outras variedades, bem como de sua própria biomassa.

Por exemplo, celulose, hemicelulose e lignina alvos - que juntas representam aproximadamente 75% de biomassa de forragem de milho - são esperadas hidrolisar mais do que duas vezes a biomassa lignocelulósica comparadas a uma aproximação de somente celulase.

Em adição a hidrolização do substrato putativo, enzimas expressas por planta podem também ter um efeito de degradação/hidrólise em outros polissacarídeos também. Por exemplo, A Figura 18 ilustra a capacidade de E1 expressa em plantas para reduzir o grau de polimerização (DP) não apenas de celulose, mas de hemicelulose, aumentando os níveis de xilose, bem como os níveis de glicose.

Os genes de enzima incorporados em plantas de acordo com a presente invenção preferivelmente exibem duas propriedades: eles são ambos estáveis a calor e mostram atividade otimizada em temperaturas de produção de etanol desejadas. As vantagens incluem (1) baixa atividade enzimática sob condições de crescimento de planta normais, impedindo, desse modo, ou minimizando, efeitos adversos ao crescimento de planta ("arraste de rendimento") e (2) expressão de enzima requerida inferior na planta e, desse modo, capacidade aumentada para adicionar traços de enzima adicionais à mesma planta.

Conseqüentemente, a presente invenção também proporciona plantas projetadas para expressar uma ou mais enzimas lignocelulolíticas, e exibir pelo menos um traço desejável (vide abaixo).

II- Genes para Biomassa Aumentada e Florescimento Retardado

A presente invenção proporciona plantas projetadas (isto é, geneticamente transformadas) para maximizar produção de planta de biomassa e/ou celulase, e/ou retardar florescimento de planta.

Após transição de crescimento de planta vegetativo (isto é, produção de folhas) a um estado reprodutivo (isto é, produção de flores), ambas biomassa e produção de celulase diminuem. Portanto, se o começo de florescimento pode ser retardado, isto daria a planta um período produtivo mais longo. Um benefício adicional de um retardo no florescimento seria reduzir a probabilidade de polinização cruzada entre plantas geneticamente modificadas e nativas a medida que seus tempos de florescimento seriam menos apropriados para coincidirem (isto é, bio-confinamento).

O controle de tempo de florescimento em plantas é um processo extremamente complexo, cuidadosamente regulado de desenvolvimento de planta, com aproximadamente 80 loci genéticos conhecidos para afetar o tempo de florescimento em Arabidopsis thaliana (Y.Y. Levy and C. Dean, Plant Cell, 1998, 10: 1973-1990). Este modelo de controle multi-fatorial tenta contar a variedade de respostas de florescimento, incluindo fitohormônios e sugestões ambientais, e como elas interagem para controlar a transição de desenvolvimento para florescimento sob as condições ambientais e endógenas corretas. Em Arabidopsis, que é uma planta facultativa de dia longo, pelo menos quatro trajetórias que controlam o tempo de florescimento foram identificadas. Dois sinais que mediam trajetórias a partir do ambiente (comprimento do dia e vernalização, temperatura fria), e dois são independentes de sinais ambientais externos (autônomo e dependente de ácido Giberélico), e parecem monitorar o estado de desenvolvimento endógeno da planta (Y.Y. Levy and C. Dean, Plant Cell, 1998, 10:1973-1990).

A interação do tempo de florescimento chave de genes de Arabidopsis é agora totalmente bem compreendida. De modo a retardar este

processo de desenvolvimento, é necessário descontrolar o equilíbrio usual do fluxo de informação, ou pelo rompimento de um gene promocional, ou por aumento da atividade de um gene inibitório. Um bom candidato para isto é o inibidor Flowering Locus C gene, ou FLC. Este é um repressor dependente da dosagem de florescimento em Arabidopsis (S.D. Michaels and R.M. Amasino, Plant Cell, 1999, 11: 949-056), que opera pela regulação negativamente da expressão de genes que promovem florescimento, tal como SOC1 e FT.

FLC é um dos genes regulatórios chaves na indução floral e respostas integrados de ambas trajetória(s) de florescimento autônoma(s). (D.T. Rouse et al., The Plant Journal, 2002, 29: 183-191; H. Zhang e S. van Nocker, The Plant Journal, 2002, 31: 663-673) e a trajetória de vernalização (H. Zhang and S. van Nocker, The Plant Journal, 2002, 31: 663-673; J. Moon et al., The Plant Journal, 2003, 35: 613-623). A expressão de Arabidopsis FLC (AtFLC) foi mostrada retardar o florescimento em ambos Brassica napus (M. Tadege et al., The Plant Journal, 2001, 28: 5545-553), e arroz. Oryza sativa (M. Tadege et al., Plant Biotchnol. J., 2003, 1: 361-369), e experimentos recíprocos que expressam B. napus ortólogos de FLC (BnFLC1-5) em Arabidopsis também retardam significantemente o florescimento (M. Tadege et al., The Plant Journal, 2001, 28: 545-553). A eficiência de AtFLC no retardo de florescimento em espécies tão diversas quanto Brassica (um dicot) e arroz (um monocot) destaca a ubiquitidade deste produto de gene em indução floral. Importantemente, quando introduzido a Arabidopsis, folhas compactas produzidas de FLC junto com um retardo de longo prazo no florescimento (S.D, Michaels and R. M. Amasino, Plant Cell, 1999, 11: 949-956). Este aumento na biomassa é altamente desejável para aplicações de biocombustíveis e fitoremediação.

Conforme mostrado na seção de Exemplos abaixo, a Requerente confirmou que a expressão de AtFLC em tabaco retarda o florescimento e aumenta significantemente a biomassa da planta. Portanto, o papel central que FLC desempenha na repressão de indução floral o torna uma escolha ideal para retardar o florescimento de milho como um método de bioconfi-

namento, e aumenta a biomassa de planta de milho.

Conseqüentemente, a presente invenção proporciona plantas que são projetadas para expressar FLC e produzir pelo menos uma enzima lignocelulolítica (por exemplo, uma celulase, uma hemicelulase ou uma lignase), que pode ser usada vantajosamente na produção de etanol.

Também providas pela presente invenção são plantas que são projetadas para produzir pelo menos uma enzima lignocelulolítica, e que são modificadas (por exemplo, projetadas) para esterilidade total (isto é, bioconfinamento). Os genes e técnicas para indução de esterilidade total de planta são conhecidos na técnica.

III. Genes de Fermentação

Em um aspecto, a presente invenção proporciona plantas projetadas (isto é, geneticamente transformadas) para expressar substâncias (por exemplo, enzimas) que são envolvidas na fermentação de açúcares de planta em álcool e/ou substâncias que podem auxiliar no processo de fermentação.

Por exemplo, genes de levedura podem ser incorporados no genoma de plantas. Tais genes podem ser obtidos de leveduras diferentes tais como Candida kefyr, Pichia stipitis, cepas deficientes repiratórias de Saccharomyces cerevisiae, Hansenula anomala, Hansenula jadinii, Hansenula fabiani e Pachysolen tannaphilus.

Seria particularmente vantajoso incorporar um gene que expressa uma enzima que converte pentoses (por exemplo, xilose ou arabinose resultante de hidrólise de hemicelulose) a açúcares mais facilmente fermentados. S. cerevisiae, que é geralmente usado no processo de fermentação envolvido na produção de etanol, fermenta os açúcares hexose, glicose, galactose e mannose, mas é usual fermentar os açúcares pentose xilose e arabonose devido a falta de uma ou mais etapas enzimáticas. S. cerevisiae pode fermentar xilulose, um produto de isomerização de xilose, em etanol (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1980,94:248-254; Chiang et al., Appl. Environ. Microbiol., 1981, 42:84-289; Senac e Hahn-Hagerdal, Appl. Environ. Microbiol. 56:120-126, 1990). Portanto, a incorporação de um

gene para um isomerase que converte xilose em xilulose permitiria uso mais eficiente de hemicelulose para produção de etanol, e reduz os problemas associados com açúcares não-fermentados deixados em grão destilado seco (DDG).

Nas células eucarióticas, o metabolismo inicial de xilose é catalisado por uma xilose reductase (XR), que reduz xilose a xilitol, e um xilitol dehidrogenase (XDH), que oxida xilitol a xilulose. A xilulose é, em seguida, fosforilatada a xilulose 5-fosfato por uma xilulose kinase (XK) e, adicionalmente, metabolizada através da trajetória de pentose fosfato e glicólises a etanol. Fontes de XR e XHD incluem leveduras de fermentação de xilose, Pachysolen tannophilus (Toivola et al., Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47: 1221-1223), Candida shehatae (J. C. Dupreez e J. P. van der Walt, Biotechnol. Lett., 1983, 5: 357-362) e Pichia stipitis (Grootjen et al., Enzyme Microb. Technol., 1990, 12: 20-23), que foram extensivamente caracterizadas. Os genes para XR e XDH a partir da levedura de fermentação de xilose Pichia stipitis foram clonados (WO 91/15588; Kotter e Criacy, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38:776-783, 1993 e referências aqui citadas).

Em certas concretizações, uma planta transgênica de acordo com a presente invenção é projetada para compreender um ou mais genes que codifica uma ou mais enzimas que convertem xilose a xilulose (por exemplo, genes que codificam XR ou XDH).

Alternativamente ou adicionalmente, uma planta transgênica da invenção pode ser projetada para compreender um ou mais genes que codificam substâncias que podem auxiliar no processo de fermentação envolvido na produção de biomassa de estoques de alimentação de biomassa. Exemplos de tais genes incluem genes que proporcionam entendimento de planta aumentado de nutrientes necessitados por microorganismos usados no processo de fermentação, tais como PHT1 ou NRT1. Nutrientes que permitem crescimento de microorganismos de fermentação incluem, por exemplo, magnésio, nitrogênio, potássio, fosfato, metais e vitaminas. Outros exemplos de genes adequados incluem genes que produzem antibióticos resistentes a calor, ou compostos bacteriais para impedir contaminação bacterial da mis-

tura. Certas bactérias causam produção de ácido acético e ácido láctico que são tóxicos a levedura, que causam um problema importante aos produtores de etanol. Outros exemplos de genes adequados incluem genes que produzem substâncias que alteram a viscosidade da mistura de biomassa durante processamento, tal como a hidrólise de polissacarídeos e ligninas por enzimas lignocelulolíticas. A manutenção da viscosidade alvo da mistura é um objetivo importante do produtor de etanol.

IV. Construções de Ácido Nucléico

As construções de ácido nucléico a serem usadas na prática da presente invenção envolvem geralmente cassetes de expressão para expressão na planta de interesse. O cassete geralmente inclui seqüências regulatórias 5' e 3' operavelmente ligadas a uma seqüência de nucleotídeo que codifica uma enzima lignocelulolítica (por exemplo, uma celulase, uma hemicelulase ou ligninase).

Cassetes de Expressão

As técnicas usadas para isolar ou clonar um gene que codifica uma enzima (por exemplo, uma enzima lignoceculolítica) são conhecidas na técnica, e incluem isolamento de DNA genômico, preparação de cDNA, ou uma combinação destas. A clonagem de um gene de tal DNA genômico, pode ser afetada, por exemplo, pelo uso de reação de cadeia de polimerase (PCR), ou bibliotecas de classificação ou expressão de anticorpo para detectar fragmentos de DNA clonado com características estruturais compartilhadas (Innis et al., "PCR: A Guide to Method and Application", 1990, Academic Press: New York). Outros procedimentos de amplificação de ácido nucléico, tais como reação de cadeia de ligase (LCR), transcrição ativada ligada (LAT), e amplificação baseada em seqüência de nucleotídeo (NASBA), podem ser usadas.

O cassete de expressão geralmente incluirá na direção 5'-3' de transcrição, uma região de iniciação transcricional e translacional, uma seqüência de codificação para uma enzima lignocelulolítica, e uma região funcional de terminação transcricional e translacional em plantas. A região de iniciação transcricional, isto é, o promotor, pode ser nativa ou análoga (isto

é, encontrada na planta nativa), ou estranha ou heteróloga (isto é, não encontrada na planta nativa) para o hospedeiro da planta. Adicionalmente, o promotor pode ser a seqüência natural, ou, alternativamente, uma seqüência sintética.

Em certas concretizações, o promotor é um promotor de planta constitutivo. Exemplos de promotores de planta incluem, mas não estão limitados a, o promotor de vírus de mosaico de couve-flor (CaMV) 35S, um promotor de sintase napolina, e um promotor de sintase octopina. Exemplos de outros promotores constitutivos usados em plantas são o promotor 19S, e promotores de genes que codificam actin e ubiquitin. Os promotores podem ser obtidos de DNA genômico pelo uso de reação de cadeia polimerase (PCR) e, em seguida, clonados na construção.

Outras seqüências que podem estar presentes nas construções de ácido nucléico são seqüências que aumentam a expressão de gene, tais como seqüências de íntron e seqüências condutoras. Exemplos de introns que podem ser reportados para aumentar expressão incluem, mas não estão limitados a, os introns do gene de Milho Adh1 do gene de Milho bronze 1 (J. Callis et al., Genes Develop. 1987, 1: 1183-1200). Exemplos de seqüências condutoras não-transladadas que são conhecidos por aumentar expressão incluem, mas não estão limitadas a, seqüências condutoras de Vírus de Mosaico de Tabaco (TMV, a "ômega-seqüência"), Vírus Estampado Clorótico de Milho (MCMV), e Vírus de Mosaico de Alface (A1MV) (vide, por exemplo, D. R. Gallie et al., Nucl. Acids Res. 1987, 15:8693-8711; J. M. Skuzeski et al., Plant Mol. Biol. 1990, 15:65-79).

A região de terminação transcricional e translacional pode ser nativa com a região de iniciação de transcrição, pode ser nativa com a seqüência de polinucleotídeo operavelmente ligada de interesse, ou pode ser derivada de outra fonte. Regiões de terminação convenientes são disponíveis de T_1-plasmídeo de A. tumefaciens, tais como regiões de terminação de sintase octopina e sintase napolina (An et al., Plant Cell, 1989, 1: 115-122; Guerineau et al., Mol. Gen. Genet. 1991, 262: 141-144; Proudfoot, Cell, 1991, 64: 671-674; Sanfacon et al., Genes Dev. 1991, 5: 141-149; Mogen et

al., Plant Cell, 1990, 2: 1261-1272; Munroe et al., Gene, 1990, 91:151-158; Ballas et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17: 7891-7903; e Joshi et al., Nucleic Acid Res., 1987, 15: 9627-9639).

Onde apropriado, o(s) gene(s) ou seqüência(s) de polinucleotídeo que codifica(m) a(s) enzima(s) de interesse pode(m) ser modificado(s) para incluir códons para expressão na planta transformada (Campbell and Gowri, Plant Physiol., 1990, 92:1-11; Murray et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17:477-498; Wada et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18: 2367, e Patentes dos Estados Unidos N°s 5.096.825; 5.380.831; 5.436.391; 5.625.136; 5.670.356 e 5.874.304). As seqüências otimizadas de códon são seqüências sintéticas, e, preferivelmente, codificam o polipeptídeo idêntico (ou um fragmento enzimaticamente ativo de um polipeptídeo de comprimento total que tem substancialmente a mesma atividade conforme o polipeptídeo de comprimento total) codificado pelo polinucleotídeo de origem otimizado sem códon que codifica uma enzima lignolelulolítica.

Outras Seqüências de Polinucleotídeo

Componentes opcionais de construções de ácido nucléico incluem um ou mais genes marcadores. Os genes marcadores são genes que concedem um fenótipo distinto a células que expressam o gene marcador e, desse modo, permitem que as células transformadas sejam distinguidas de células que não têm o marcador. Tais genes podem codificar ou um marcador selecionável, ou um marcador classificável. O fenótipo característico permite a identificação de células, grupos de células, tecidos, órgãos, partes de planta ou plantas totais contendo a construção. Muitos exemplos de genes marcadores adequados são conhecidos na técnica. O marcador pode também conferir benefício(s) adicional(is) à planta transgênica, tal como resistência a herbicida, resistência à inseto, resistência à doença, e tolerância aumentada a tensão ambiental (por exemplo, secura).

Alternativamente, o gene marcador pode proporcionar alguma resposta visivelmente reativa (por exemplo, pode causar uma aparência distintiva, tal como modelo de cor ou crescimento em relação as plantas ou células de planta que não expressam o gene marcador selecionável na pre-

sença de alguma substância, ou conforme aplicado diretamente à planta ou células de planta, ou conforme presente na planta ou meio de crescimento de célula de planta). É agora bem-conhecido na técnica que ativadores transcricionais de biosíntese de antocianin, operavelmente ligados a um promotor adequado em uma construção, tem utilidade difundida como marcadores não-fitotóxicos para transformação de célula de planta.

Exemplos de marcadores que proporcionam resistência à herbicidas incluem, mas não estão limitado a, o gene bar de Streptomyces hygroscopicus que codifica fosfinotricin acetilase (PAT), que confere resistência ao herbicida glufosinato; genes mutantes que codificam resistência à imidazolinona ou sulfoniluréia, tais como genes que codificam forma mutante da enzima ALS e AHAS (Lee et al., EMBO J., 1988, 7: 1241; Miki et al., Theor. Appl. Genet., 1990, 80: 449; e Patentes dos Estados Unidos N° 5.773.702); genes que conferem resistência à glicofosfato, tais como formas mutantes de EPSP sintase e aroA; resistência à L-fosfinotricin, tais como genes glutamina sintase; resistência à glufosinato, tais como o gene de fosfinotricin acetil transferase (PAT e bar); e resistência à ácidos fenóxi propiônicos e ciclohexonas, tais como os genes que codificam inibidor ACCAse (Marshall et al., Theor. Appl. Gebet. 1992, 83:435).

Exemplos de genes que conferem resistência à pestes ou doenças incluem, mas não estão limitados a, genes que codificam uma proteína Bacillus thuringiensis, tal como a delta-endoxina (Patente dos Estados Unidos N° 6.100.456); genes que codificam lectins (Van Damme et al., Plant Mol. Biol., 1994, 24: 825); genes que codificam proteínas de ligação de vitamina, tais como avidin e homólogos de avidin que podem ser usados como larvicidas contra pestes de inseto; genes que codificam inibidores de protease ou amilase, tais como o inibidor cisteína proteinase de arroz (Abe et al., J. Biol. Chem., 1987, 262: 16793), e o inibidor proteinase de tabaco I (Hubb et al., Plant Mol. Biol., 1993, 21:985); genes que codificam hormônios ou feromônios específicos de inseto, tais como hormônio ecdisteróide e juvenile, e variantes destes, miméticos baseados nestes, ou antagonistas ou agonísticos destes; genes que codificam peptídeos ou neuropeptídeos específicos

de inseto que, após expressão, rompem a fisiologia da peste; genes que codificam venom específico de inseto, tais como aqueles produzidos por um vespa, serpente, etc; genes que codificam enzimas responsáveis pelo acúmulo de monoterpenos, sesquiterpenos, asteróide, ácido hidroxâmico, derivado de fenilpropanóide, ou outra molécula de não-proteína com atividade inseticidal; gene que codificam enzimas envolvidas na modificação de uma molécula biologicamente ativa (Patente dos Estados Unidos N 5.539.095); genes que codificam peptídeos que estimulam transdução de sinal; genes que codificam peptídeos de momento hidrofóbicos, tais como derivados de Taechyplesin que inibe patogenias fungais; genes que codificam uma membrana permease, um formador de canal ou bloqueador de canal (Jaynes et al., Plant. Sci., 1993, 89:43), genes que codificam uma proteína invasiva viral, ou derivado de toxin complexo a partir desta (Beachy et al., Ann. Rev. Phytopathol., 1990, 28: 451); genes que codificam um anticorpo específico de inseto, ou antitoxin, ou um anticorpo específico de vírus (Tavladoraki et al, Nature, 1993, 366: 469); e genes que codificam uma proteína de captura de desenvolvimento produzida por uma planta, patógeno ou parasita que previne doença.

Exemplos de genes que conferem resistência à tensão ambiental incluem, mas não estão limitados a, mtld e HVA1, que são genes que conferem resistência a fatores de tensão ambiental; rd29A e rd19B, que são genes de Arabidopsis thaliana que codificam proteínas hidrofílicas que são induzidas em resposta à desidratação, baixa temperatura, tensão de sal, ou exposição a ácido abscísico, e capacitam a planta a tolerar a tensão (Yamagushi-Shinozaki et al., Plant Cell, 1994, 6: 251-264). Outros genes contemplados podem ser encontrados nas Patentes dos Estados Unidos N° 5.296.462 e 5.356.816.

Expressão Específica de Tecido

Em certas concretizações, a expressão de enzima lignocelulolítica é objetivada para tecidos específicos da planta transgênica. Por exemplo, a expressão especifica de tecido pode ser realizada para expressar preferencialmente enzimas nas folhas e caules preferivelmente do que grão ou

semente (que pode reduzir interesse sobre consumo humano de organismo geneticamente modificado (GMOs)). A expressão específica de tecido tem outros benefícios, incluindo expressão objetivada de enzima(s) para o substrato apropriado.

A expressão específica de tecido pode ser funcionalmente acompanhada pela introdução de um gene constitutivamente expresso em combinação com um gene de antisentido que é expresso somente naqueles tecidos onde o produto de gene (por exemplo, enzima lignocelulolítica) não é desejado. Por exemplo, um gene que codifica para uma enzima lignocelulolítica pode ser introduzido tal que ele seja a expressão em todos os tecidos usando o promotor 35S de Vírus de Mosaico de Couve-flor. A expressão de um transcrito de antisentido do gene em grão de milho, usando-se, por exemplo, um promotor zeina, preveniria o acúmulo da enzima lignocelulolítica na semente. Conseqüentemente, a enzima codificada pelo gene introduzido estaria presente em todos os tecidos, exceto no grão.

Além disso, vários genes regulados específicos de tecido e/ou promotores foram reportados nas plantas. Alguns genes específico de tecido reportados incluem os genes que codificam as proteínas de armazenamento de semente (tais como, napin, cruciferin, β-conglicinin, e faseolin) zeina ou proteínas de corpo de óleo (tal como oleosina), ou genes envolvidos em biosíntese de ácido graxo (incluindo proteína transportadora acetila, esteoril-ACP desaturase, e desaturases de ácido graxo (fad 2-1)), e outro genes expressos durante desenvolvimento de embrião, tais como Bce4 (Krill et al., Seed Science Research, 1991, 1: 209). Os exemplos de promotores específicos de tecido, que foram descritos, incluem o lectin (Vodkin, Prog. Clin. Biol. Res., 983, 138:87; Lindston et al., Der. Genet., 1990, 11: 160), álcool de milho dehidrogenase 1 (Dennis et al., Nucleic Acids Res., 1984, 12: 1983), complexo de colheita leve de milho (Bansal et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89: 3654), proteína de choque de calor de milho, subunidade pequena de ervilha RuBP carboxilase, Ti plasmídeo sintase manopina, Ti plasmídeo sintase napolina, petúnia chalcone isomerase (van Tunen et al., EMBO J;. 1988 7:125), proteína 1 rica em glicina de feijão (Keller et al., Ge-

nes Dev., 1983, 3:1639), CaMV truncado 35s (Odell et al., Nature, 1985, 313: 810), batata patatin (Wenzler et al., Plant Mol. Biol., 1989, 13:347), célula de raiz (Yamamoto et al., Nucleic Acids Res., 1990, 18: 7449), zeina de milho (Reina et al., Nucleic Acids Res., 1990, 18: 6425; Kriz et al., Gen. Genet. 1987, 207: 90; Wandelt et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17 2354), PEPCase, promotores associados a complexo de gene R (Chandler et al., Plant Cell, 1989, 1: 1175), e promotores sintase chalcone (Franken et al., EMBO J., 1991, 10: 2605). Particularmente úteis para expressão específica de semente é o promotor vicilin de ervilha (Czako et al., Mol. Gen. Genet., 1992, 235:33).

Expressão Específica Celular

Em algumas concretizações, a expressão de enzima lignocelulolítica é objetivada para especificar compartimentos celulares ou organelas, tais como, por exemplo, o citosol, o vacúolo, o núcleo, o retículo endoplasmático, a mitocôndria, o apoplasto, as peroxisomas, ou plastídeos. O direcionamento da enzima lignocelulolítica a um compartimento de célula específico ou organela permitirá que a enzima esteja localizada tal que ela não entrará em contato com o substrato durante crescimento da planta. A ação enzimática da enzima não ocorrerá até que a enzima contacte seu substrato, por exemplo, seguindo rompimento físico da integridade da célula por moagem.

Em particular, a presente invenção proporciona plantas projetadas para expressarem uma ou mais enzimas lignocelulolíticas no apoplasto, no cloroplasto e/ou no vacúolo. A objetivação da expressão de uma enzima lignocelulolítica para a parede de célula (como no apoplasto) pode ajudar a superar a dificuldade de mistura de celulose hidrofóbica e enzimas hidrofílicas que tornam difícil alcançar hidrólise eficiente com enzimas externas.

A presente invenção proporciona plantas projetadas para expressarem uma enzima lignocelulolítica (ou várias enzimas lignocelulolíticas) em mais do que um compartimento celular ou organela. Pelo uso de promotores alvos em diferentes localizações na célula de planta, pode-se aumentar a enzima total produzida na planta. Desse modo, por exemplo, usando-se

um promotor de apoplasto com gene E1, e um promotor de cloroplasto com o gene E1, em uma planta, aumentaria a produção total de E1 comparada a um promotor simples/construção de E1 na planta. Além disso, pelo uso de promotores alvos em localizações diferentes na planta no caso de expressão de enzimas lignocelulolíticas múltiplas, pode-se minimizar desconstrução in vivo (pré-processamento) da parede de célula que ocorre quando enzimas sinergísticas múltiplas estão presentes em uma célula. Por exemplo, a combinação de uma endonuclease com promotor de apoplasto seqüestra cada enzima em uma parte diferente da célula, e alcança as vantagens listadas acima. Este método tira vantagem da massa de enzima que pode ser expressa em uma organela simples ou localização da célula.

A localização de uma proteína codificada nuclear (por exemplo, enzima) dentro da célula é conhecida para ser determinada pela seqüência de aminoácido da proteína. A localização da proteína pode ser alterada pela modificação da seqüência de nucleotídeo que codifica a proteína de tal maneira a alterar a seqüência de aminoácido de proteína. As seqüências de polinucleotídeo que codificam enzimas ligno-celulósicas podem ser alteradas para redirecionar a localização celular das enzimas codificadas por qualquer método adequado (Dai et al., Trans. Res., 2005, 14:627).

Vetores de Expressão

As construções de ácido nucléico, de acordo com a presente invenção, podem ser clonadas em um vetor, tal como, por exemplo, um plasmídeo. Vetores adequados para transformação de células de planta incluem, mas não estão limitados a, Ti plasmídeos de Agrobactéria tumefaciens (J. Darnell, H. F. Lodish e D. Baltimore, "Molecular Cell Biology", 2nd Ed., 1990, Scientific American Books: New York), um plasmídeo contendo um gene β-glucuronidase e um promotor (CaMV) de vírus de mosaico de couve-flor, mais uma seqüência condutora de vírus de mosaico de alfafa (L. C. Sanford et al., Plant Mol. Biol. 1993, 22: 751-765), ou um plasmídeo contendo um gene bar clonado à jusante de um promotor 35S CaMV, e um condutor (TMV) de vírus de mosaico de tabaco. Outros plasmídeos podem adicionalmente conterem introns, tais como aqueles derivados de álcool dehidroge-

nase (Adh1), ou outras seqüências de DNA. O tamanho do vetor não é um fator limitante.

Para construções pretendidas para serem usadas em transformação medida por Agrobactéria, o plasmídeo pode conter uma origem de replicação que permite que ele replique em Agrobactéria e uma origem de número de cópia alto de replicon funcional em E. coli. Isto permite produção fácil e teste de transgene em E. coli antes de transferência para Agrobactéria para introdução subseqüente em plantas. Os genes de resistência podem ser conduzidos no vetor, um para seleção na bactéria, por exemplo, estreptomocina, e outro que funcionará em plantas, por exemplo, um gene que codifica resistência à canamicina, ou resistência à herbicida. Também presentes no vetor são locais de endonuclease de restrição para a adição de um ou mais transgenes, e seqüências de margem de T-DNA direcional que, quando reconhecidas pelas funções de transferência de Agrobactéria, delimitam a região deDNA que será transferida para a planta.

Os métodos de preparação de construções de ácido nucléico e vetores de expressão são bem-conhecidos na técnica, e podem ser encontrados descritos em vários textos de livro, tais como, por exemplo, J. Sambrook, E.F. Fritsch e T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, e T. J. Silhavy, M. L. Berman, e L. W. Enquist, "Experiments with Gene Fusions", 1984, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor; F.M. Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", 1989, John Wiley & Sons: New York.

Propriedades desejáveis adicionais das plantas transgênicass podem incluir, mas não estão limitadas a, capacidade de se adaptar a crescimento em várias condições de clima e solo; sistema de modelo genético estudado; incorporação de características de bioconfinamento, tais como flores estéreis macho (ou total); incorporação de características de fitorremediação, tais como hiper-acúmulo de contaminante, biomassa maior, ou promoção de mycorrhizae de degradação de contaminante.

V. Preparação de Plantas transgênicass

As construções de ácido nucléico, tais como aquelas descritas

acima, podem ser usadas para transformar qualquer planta incluindo monocots e dicots. Em algumas concretizações, as plantas são plantas de campo verde. Em outras concretizações, as plantas são crescidas especificamente para "energia de biomassa" e/ou fitorremediação. Exemplos de plantas adequadas para uso nos métodos da presente invenção incluem, mas não estão limitados a, milho, grama, sorgo, "miscanthus", cana de açúcar, álamo, pinho, trigo, arroz, soja, algodão, cevada, grama de relvado, tabaco, bambu, colza, beterraba de açúcar, girassol, salgueiro, e eucalipto. Usando-se método de transformação, plantas geneticamente modificadas, células de planta, tecido de planta, sementes, e similares, podem ser obtidas.

A transformação de acordo com a presente invenção pode ser realizada por qualquer método adequado. Em certas concretizações, a transformação compreende etapas de introduzir uma construção de ácido nucléico, conforme descrito acima, em uma célula de planta, ou protoplasto, para obter uma célula de planta estavelmente transformada, ou protoplasto; e regeneração de uma planta total a partir da célula de planta estavelmente transformada, ou protoplasto.

Transformação de Célula

A distribuição ou introdução de uma construção de ácido nucléico em células eucarióticas podem ser acompanhadas usando-se qualquer de uma variedade de métodos. O método usado para a transformação não é crítico à presente invenção. Técnicas adequadas incluem, mas não estão limitadas a, métodos não-biológicos, tais como micro-injeção, bombardeio de microprojétil, eletroporação, entendimento induzido, e injeção de feixe de aerosol, bem como métodos biológicos, tais como entendimento de DNA direto, lipossomas e transformação mediada por Agrobactéria. Quaisquer combinações dos métodos acima que proporcionam transformação eficiente de células de planta, ou protoplastos, podem também serem usados na prática da invenção.

Os métodos de introdução de construções de ácido nucléico em células de planta, ou protoplastos, foram descritos. Vide, por exemplo, "Methods for Plant Molecular Biology", Weissbach e Weissbach (Eds), 1989, A-

cademic Press, Inc., "Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods", 1995, Springer-Verlag: Berlin, Germany; e Patentes dos Estados Unidos N°s 4.945.050; 5.036.006; 5.100.792; 5.240.855; 5.302.523; 5.322.783; 5.324.646; 5.384.253; 5.464.765; 5.538.877; 5.538.880; 5.550.318; 5.563.055; e 5.591.616).

Em particular, a eletroporação foi freqüentemente usada para transformar células de planta (vide, por exemplo, Patente dos Estados Unidos N° 5.384.253). Este método é geralmente realizado usando-se tecidos friáveis (tais como uma cultura de suspensão de células, ou calo embriogênbico), ou células recipientes alvos de embriões imaturos, ou outro tecido organizado que foi tornado mais susceptível a transformação por eletroporação pela exposição das mesmas a enzimas de degradação de pectin, ou expondo as mesmas mecanicamente em uma maneira controlada. Células intactas de milho (vide, por exemplo, K. D'Halluin et al., Plant cell, 1992, 4: 1495-1505; C.A. Rhodes et al., Methods Mol. Biol. 1995, 55: 121-131, e Patente dos Estados Unidos N° 5.384.253), milho, tomate, feijão-soja, e tabaco foram transformados por eletroporação. Conforme revisto, por exemplo, por G. W. Bates (Methods Mol. Biol. 1999, 111: 359-366), eletroporação pode também ser usada para transformar protoplastos.

Outro método de transformação é bombardeio de microprojétil (vide, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos N°s 5.538.880; 5.550.318; e 5.610.042; e WO 94/09699). Neste método, ácidos nucléicos são distribuídos para células vivas por revestimento ou precipitação dos ácidos nucléicos em uma partícula ou microprojétil (por exemplo, tungstênio, platina ou ouro), e impulsionando o microprojétil revestido na célula viva. As técnicas de bombardeio de microprojétil são amplamente aplicáveis, e podem ser usadas para transformar virtualmente qualquer espécie de planta monocotiledônea e dicotiledônea (vide, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos N°s 5.036.006; 5.302.523; 5.322.783 e 5.563.055; WO 95/06128; A. Ritala et al., Plant Mol. Biol. 1994, 24: 317-325; L. A. Hengens et al., Plant Mol. Biol. 1993, 23: 643-669; L.A. Hengens et al., Plant Mol. Biol. 1993, 22: 1101-1127; C. M. Buising e R.M. Benbow, Mol. Gen. Genet. 1994, 243:71-81; C. Singsit

et al., Transgenic Res. 1997, 6: 169-176).

O uso de transformação mediada por Agrobactéria de células de planta é bem-conhecido na técnica (vide, por exemplo, Patente dos Estados Unidos N° 5.563.055). Este método tem sido há muito usado na transformação de plantas dicotiledônea, incluindo Arabidopsis e tabaco, e tornou-se recentemente aplicável a plantas monocotiledôneas, tais como arroz, trigo, cevada e milho (vide, por exemplo, Patente dos Estados Unido N° 5.591.616). Em cepas de planta onde transformação mediada por Agrobactéria é eficiente, ele é freqüentemente o método de escolha devido a natureza fácil e definida da transferência de gene. A transformação mediada por Agrobactéria de células de planta é efetuada em duas fases. Primeiro, as etapas de clonagem e modificações de DNA são realizadas em E. coli, e, em seguida, o plasmídeo contendo a construção de gene de interesse é transferido por tratamento de choque térmico em Agrobactéria, e a cepa de Agrobactéria resultante é usada para transformar células de planta.

A transformação de protoplastos de planta pode ser efetuada usando-se métodos baseados na precipitação de fosfato de cálcio, tratamento de polietileno glicol, eletroporação, e combinações destes tratamentos (vide, por exemplo, I. Potrykus et al., Mol. Gen. Genet. 1985, 199: 169-177; M.E. Fromm et al., Nature, 1986, 31: 791-793; J. Callis et al., Genes Dev. 1987, 1: 1183-1200; S. Omirulleh et al., Plant Mol. Biol. 1993, 21:415-428).

Métodos alternativos de transformação de célula de planta, que foram revistos, por exemplo, por M. Rakoczy-Trojanowska (Cell Mol. Biol. Lett. 2002, 7:849-858), podem também serem usados na prática da presente invenção.

A distribuição bem-sucedida da construção de ácido nucléico na célula de planta hospedeira, ou protoplasto, pode ser preliminarmente avaliada visualmente. A seleção de células de planta estavelmente transformadas pode ser realizada, por exemplo, pela introdução na célula, de uma construção de ácido nucléico compreendendo um gene marcador que confere resistência a algum agente normalmente inibitório, tal como um antibiótico ou herbicida. Exemplos de antibióticos que podem ser usados incluem os

antibióticos aminoglicosídeo neomicin e paromomicin, ou o antibiótico higromicin. Exemplos de herbicidas que podem ser usados incluem fosfinotricin e glifosato. As células potencialmente transformadas são, em seguida, expostas a agente seletivo. As células onde o gene de conferência de resistência foi integrado e expresso em níveis suficientes para permitir sobrevivência da célula geralmente estarão presentes na população de células de sobrevivência.

Alternativamente, as células hospedeiras compreendendo uma seqüência de ácido nucléico da invenção, e que expressam seu produto de gene, podem ser identificadas e selecionadas por uma variedade de procedimentos, incluindo, hibridização de DNA-DNA ou DNA-RNA, e bioensaio de proteína, ou técnicas de imunoensaio, tais tecnologias baseadas em membrana, solução ou apara, para detecção e/ou qualificação de ácido nucléico ou proteína.

As células de planta são disponíveis de uma ampla variedade de fontes, incluindo a American Type Culture Collection (Rockland, MD), ou de qualquer de um número de companhias de semente incluindo, por exemplo, A. Atlee Burpee Seed Co. (Warminster, PA), Park Seed Co. (Greenwood, SC), Johnny Seed Co. (Albion, ME), ou Northurp King Seeds (Hartsville, SC). As descrições e fontes de células hospedeiras úteis são encontradas em I.K. Vasil, "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants", Vol. I, II e II; 1984, Laboratory Procedures and Their Applications Academic Press: New York; R.A. Dixon et al., "Plant Cell Culture - A Practical Approach", 1985, IRL Press: Oxford University, e Green et al., "Plant Tissue and Cell Culture", 1987, Academic Press: New York.

As células de planta ou protoplastos estavelmente transformados, de acordo com a presente invenção, são aqui providos.

Regeneração de Planta

Nas plantas, toda célula é capaz de regenerar em uma planta madura, e, em adição, contribuindo para a linha de germe, tal que gerações subseqüentes da planta conterão o transgene de interesse. Células estavelmente transformadas podem ser crescidas em plantas de acordo com mo-

dos convencionais (vide, por exemplo, McCormick et al., Plant Cell Reports, 1986, 5: 81-84). A regeneração de planta de protoplastos cultivados foi descrita, por exemplo, por Evans et al., "Handbook of Plant Cell Cultures", Vol. 1, 1983, MacMilan Publishing Co: New York; e I.R. Vasi (Ed.), "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants", Vol. I (1984) e Vol. II (1986), Acad. Press: Orlando.

Os meios para regeneração variam de espécie para espécie, mas geralmente uma suspensão de protoplastos transformados, ou uma placa de Petri contendo explantes transformados, são primeiro providos. O tecido de calo é formado, e projeções podem ser induzidas de calo e raízes subseqüentes. Alternativamente, a formação de embrião somático pode ser induzida no tecido de calo. Estes embriões somáticos germinam como embriões naturais para formar plantas. O meio de cultura conterá geralmente vários aminoácidos e hormônios de planta, tais como auxina e citoquininas. Ácido glutâmico e prolina podem ser também adicionados ao meio. A regeneração eficiente depende do meio, do genótipo, e da história da cultura.

A regeneração de células individuais transformadas para obter plantas totais transgênicas foi mostrada ser possível para um grande número de plantas. Por exemplo, a regeneração foi demonstrada para dicots (tais como maçã, Malus pumila; amora-preta; amora, híbrido de amora preta/framboesa, amora, franboesa vermelha, amora, cenoura, Daucus carota; couve-flor; Brassica oleracea; aipo; Apium graveolens; pepino; Cucumis sativus; berinjela; Solanum melongena; alface; Lactuca sativa; Solanum tuberosum; colza; Brassica napus; feijão-soja (selvagem); Glicina Canescens; morango; Fragaria x ananassa; tomate; Lycopersicon esculentum; noz, Juglans regia; melão; Cucumis melo; uva; Vitis vinifera; manga; e Mangifera indica), bem como para monocots (tais como arroz, Oryza sativa; centeio, Secale cereale; e Milho).

As plantas transgênicass primárias podem, em seguida, serem crescidas usando-se métodos convencionais. Várias técnicas para cultivo de planta são bem-conhecidas na técnica. As plantas podem ser crescidas no solo, ou, alternativamente, podem ser crescidas hidroponicamente (vide, por

exemplo, Patentes dos Estados Unidos N°s 5.364.451; 5.393.426 e 5.785.735). As plantas transgênicass primárias podem ser, ou polinizadas com a mesma cepa transformada, ou com uma cepa diferente, e o híbrido resultante tendo as características fenotípicas desejadas identificado e selecionado. Duas ou mais gerações podem ser crescidas para assegurar que as características fenotípicas objetos sejam estavelmente mantidas e herdadas e, em seguida, as sementes são colhidas para assegurar que o fenótipo desejado ou outra propriedade tenham sido alcançados.

Conforme é bem-conhecido na técnica, as plantas podem ser crescidas em meio diferente, tais como solo, solução de crescimento, ou água.

A seleção de plantas que foram transformadas com a construção pode ser realizada por qualquer método adequado, por exemplo, com manchamento Northern, manchamento Southern, classificação de resistência à herbicida, classificação de resistência à antibiótico, ou combinações destes e outros métodos. As técnicas de Southern blot e Northern blot, que testam a presença (em um tecido de planta) de uma seqüência de ácido nucléico de interesse, e de seu RNA correspondente, respectivamente, são métodos padrões (vide, por exemplo, Sambrook & Russel, "Molecular Cloning", 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Pres: Cold Spring Harbor).

VI. Usos de Plantas transgênicass da Invenção

As plantas transgênicass e partes de planta aqui descritas podem ser usadas vantajosamente em uma variedade de aplicações. Mais especificamente, a presente invenção, que envolve plantas geneticamente projetadas para ambas biomassa aumentada e expressão de enzimas lignocelulolíticas, resulta em inovações de processo a jusante e/ou aperfeiçoamentos em uma variedade de aplicações, incluindo produção de etanol, fitorremediação, e produção de hidrogênio.

A- Produção de Etanol

As plantas transformadas de acordo com a presente invenção proporcionam um meio de aumentar rendimentos de etanol, redução de custos de pré-tratamento, pela redução de requerimentos de pré-tratamento de

ácido/calor para sacarificação de biomassa; e/ou redução de outra produção de planta e custos de processamento, tal como permitindo multiaplicações e isolamento de subprodutos comercialmente valiosos.

Cultura de Planta. Conforme já mencionado acima, os fazendeiros podem cultivar plantas transgênicass diferentes da presente invenção (por exemplo, variedade diferente de milho transgênico, cada uma expressando uma enzima lignocelulolítica, ou uma combinação de enzimas) simultaneamente, alcançando a "mistura" desejada de enzimas produzidas pela mudança da razão de semente.

Colheita de Planta. As plantas transgênicass da presente invenção podem ser colhidas conforme conhecido na técnica. Por exemplo, técnicas atuais podem cortar forragem de milho ao mesmo tempo conforme o grão é colhido, mas deixa-se a forragem assentando no campo para coleta posterior. Contudo, a sujidade coletada pela forragem pode interferir com a produção de etanol a partir do material lignocelulósico. A presente invenção proporciona um método em que as plantas transgênicass são cortadas, coletadas, armazenadas, e transportadas de modo a minimizar o contato do solo. Em adição a minimização da interferência do solo com a produção de etanol, este método pode resultar na redução na colheita e custos de transporte.

Pré-tratamento. Métodos convencionais incluem pré-tratamentos físicos, químicos, e/ou biológicos. Por exemplo, técnicas de pré-tratamento físico podem incluir um ou mais de vários tipos de moagem, trituração, irradiação, explosão por vaporização/vapor, e hidrotermólise. As técnicas de pré-tratamento químico podem incluir hidrotermólise ácida, alcalina, de solvente orgânico, amônia, dióxido de enxofre, dióxido de carbono, e de controle de pH. As técnicas de pré-tratamento biológico podem envolver aplicação de microorganismos de solubilização de lignina (T. A. Hsu, "Handbook on Bioethanol: Production and Utilization", C. E. Wyman (Ed.), 1996, Taylor & Francis: Washington, DC, 179-212; P. Ghosh e A. Singh, A., Adv. Appl. Microbiol., 1993, 39: 295-333; J. D. McMillan, em "Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production", M. Himmel et al., (Eds.), 1994, capítulo 15,

ACS Symposium Series 566, American Chemical Society: B. Hahn-Hagerdal, Enz. Microb. Tech., 1996, 18:312-331; e L. Vallander e K.E.L. Eriksson, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., 1990, 42:63-95). A proposta da etapa de pré-tratamento é quebrar a lignina e estrutura de carboidrato para produzir a fração de celulose accessível às enzimas celulolíticas.

O uso simultâneo de plantas transgênicass que expressam uma ou mais celulases, uma ou mais hemicelulases, e/ou uma ou mais ligninases, de acordo com a presente invenção, reduz ou elimina a moagem custosa da biomassa, reduz ou elimina a necessidade de calor e ácido forte requerida para retirada da lignina e hemicelulose da celulose antes da hidrolização da celulose. Portanto, a presente invenção proporciona aperfeiçoamentos sobre os métodos de pré-tratamento existentes. Tais aperfeiçoamentos podem incluir um ou mais de: redução da moagem de biomassa, eliminação de moagem de biomassa, redução da resistência de ácido na etapa de pré-tratamento, eliminação de ácido na etapa de pré-tratamento, e qualquer combinação destas.

Em certas concretizações, o material pré-tratado é usado para sacarificação sem manipulação adicional. Em outras concretizações, pode ser desejado processar o tecido de planta de modo a produzir um extrato compreendendo a(s) enzima(s) lignocelulolítica(s). Neste caso, a extração é efetuada na presença de componentes conhecidos na técnica para favorecer a extração de enzimas ativas de tecido de planta, e/ou aumentar a degradação de polissacarídeos na parede celular na biomassa lignocelulósica. Tais componentes incluem, mas não estão limitados a, sais, quelatores, detergentes, antioxidantes, polivinilpirrolidona (PVP), e polivinilpolipirrolidona (PVPP). O tecido de planta remanescente pode, em seguida, ser submetido a um processo de pré-tratamento.

Sacarificação. Na sacarificação (ou hidrólise enzimática), a lignocelulose é convertida em açúcares fermentáveis por enzimas lignocelulolíticas presentes no material pré-tratado. Se desejado, as enzimas celulósicas externas (isto é, enzimas não produzidas pelas plantas transgênicass sendo processadas) podem ser adicionadas a esta mistura. Os extratos compreen-

dendo enzimas lignocelulolíticas obtidos conforme descrito acima podem ser adicionados de volta à biomassa lignocelulósica antes da sacarificação. Aqui novamente, enzimas lignocelulolíticas externas podem ser adicionadas à mistura de reação de sacarificação.

A sacarificação é geralmente realizada em reatores de tanque agitados ou fermentadores sob pH, temperatura e condições de mistura controladas. Uma etapa de sacarificação pode durar até 200 horas. A sacarificação pode ser efetuada em temperaturas de cerca de 30°C a cerca de 65°C, em particular, ao redor de 50°C, e em um pH na faixa de entre cerca de 4 e cerca de 5, em particular, ao redor de pH 4,5. A sacarificação pode ser realizada no material pré-tratado total.

As presentes Requerentes mostraram que a adição de celulases a plantas E1-transformadas aumenta a produção total de glicose comparada a adição de celulases a plantas não-transgênicas, que sugere que simplesmente usando-se plantas E1 transgênicas com técnicas de celulase externas atuais pode substancialmente aumentar os rendimentos de etanol. O experimento também indica que a adição de plantas E1 celulases aumenta a produção total de glicose comparada a adição de celulases à plantas não-transgênicas. Isto é um resultado importante, visto que sugere que simplesmente usando-se plantas E1 transgênicas com técnicas de celulase externa atual pode aumentar substancialmente os rendimentos de etanol na presença ou ausência de processos de pré-tratamento.

Fermentação. Na etapa de fermentação, açúcares, liberados a partir da lignocelulose como um resultado das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática, são fermentados em uma ou mais substâncias orgânicas, por exemplo, etanol, por um microorganimo de fermentação, tais como leveduras e/ou bactérias. A fermentação pode também ser efetuada simultaneamente com a hidrólise enzimática nos mesmos vasos, novamente sob pH, temperatura e condições de mistura controladas. Quando a sacarificação e fermentação são realizadas simultaneamente no mesmo vaso, o processo é geralmente denominado simultaneamente sacarificação e fermentação, ou SSF.

Os microorganismos de fermentação e métodos para seu uso na produção de etanol são conhecidos na técnica (Sheehan, "The road to Bioethanol: A strategic Perspective of the US Department of Energy's National Ethanol Program" Em: "Glucosyl Hydrolases For Biomass Conversion"., ACS Symposium Series 769, 2001, American Chemical Society: Washington, DC). Os métodos de produção de etanol existentes que utilizam grão de milho como a biomassa envolvem tipicamente o uso de leveduras, particularmente cepas de Saccharomyces cerevisiae. Tais cepas podem ser utilizadas nos métodos da invenção. Enquanto tais cepas podem ser preferidas para a produção de etanol de glicose que é derivado da degradação de celulose e/ou amido, os métodos da presente invenção não dependem do uso de um microorganismo particular, ou de uma cepa deste, ou de qualquer combinação particular de referidos microorganismos e referidas cepas.

Levedura ou outros organismos são tipicamente adicionados ao hidrolizato, e a fermentação é permitida proceder por 24-96 horas, tal como 35-60 horas. A temperatura de fermentação é tipicamente entre 26-40°C, tal como 32°C, e em um pH entre 3 e 6, tal como cerca de 4-5.

Um estimulador de fermentação pode ser usado para aperfeiçoar adicionalmente o processo de fermentação, em particular, o desempenho do microorganismo de fermentação, tal como, aumento de taxa e rendimento de etanol. Os estimuladores de fermentação para crescimento incluem vitaminas e minerais. Exemplos de vitaminas incluem multivitamina, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzóico, ácido fólico, riboflavina, e vitaminas A, B, C, D e E (Alferon et al., "Improving ethanol production and viability of saccharomyces cerevisiae by a vitamin feeding strategy during fed-batch process", 2002, Springer-Verlag). Exemplos de minerais incluem minerais e sais minerais que podem suprir nutrientes compreendendo fosfato, potássio, manganês, enxofre, cálcio, ferro, zinco, magnésio e cobre.

Recuperação. Em seguida a fermentação (ou SSF), a mistura é destilada para extrair o etanol. O etanol com uma pureza maior do que 96% vol. % pode ser obtido.

Subprodutos. O processo de hidrólise de matéria-prima de lignocelulose também libera subprodutos, tais como ácidos fracos, furanos, e compostos fenólicos, que são inibitórios ao processo de fermentação. A remoção de tais subprodutos pode aumentar a fermentação. Em particular, a lignina e produtos de quebra de lignina, tais como fenóis, produzidos pela atividade enzimática e por outras atividades de processamento, a partir da biomassa celulósica sacarificada é, do mesmo modo, para ser importante para aumentar a velocidade de fermentação e manutenção da viscosidade otimizada.

Desse modo, em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de aumentar a velocidade da fermentação que compreende remoção, a partir da hidrólise, de produtos do processo enzimático que não podem ser fermentados. Tais produtos compreendem, mas não estão limitados a, lignina, produtos de quebra de lignina, fenóis, e furanos. Em certas concretizações, os produtos do processo enzimático que não podem ser fermentados podem ser separados e usados subseqüentemente. Por exemplo, os produtos podem ser queimados para proporcionar calor requerido em algumas etapas da produção de etanol, tais como sacarificação, fermentação, e destilação de etanol, reduzindo, desse modo, os custos pela redução da necessidade de fontes de energia externa atual, tal como gás natural. Alternativamente, tais subprodutos podem ter valor comercial. Por exemplo, fenóis podem encontrar aplicações como intermediários químicos para uma ampla variedade de aplicações, variando de plásticos a farmacêuticos e químicos agrícolas. O fenol condensado com aldeídos (por exemplo, metanal) produz compostos resinosos, que são a base de plásticos que são usados em equipamento elétrico, e como agentes de ligação no manufaturamento de produtos de madeira, tais como madeira compensada e cartão de fibra de média densidade (MDF).

A separação de subprodutos a partir de hidrosilato pode ser feita usando-se uma variedade de técnicas químicas e físicas que ocorrem em propriedades químicas e físicas diferentes dos subprodutos (por exemplo, lignina e fenóis). Tais técnicas incluem, mas não estão limitadas a, cromato-

grafia (por exemplo, troca de íon, afinidade, hidrofóbico, cromatofocalização, e exclusão de tamanho), procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização isoelétrica preparativa), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação de sulfato de amônia), SDS-PAGE, destilação, ou extração.

Alguns dos subprodutos de hidrólise, tais como fenóis, ou produtos de fermentação/processamento, tal como metanol, podem ser usados como desnaturantes de etanol. Atualmente, cerca de 5% de gasolina é adicionada imediatamente ao etanol destilado como um desnaturante sob o Departamento de regulações de Álcool, Tabaco e Armas de Fogo, para prevenir uso não-autorizado de não-combustível. Isto requer carregamento de gasolina para a instalação de produção de etanol, em seguida carregamento de gás de volta com o etanol para a refinaria. O gás também impede o uso de motores otimizados de etanol que fazem uso de razão de compressão mais alta de etanol, e octano mais alto para aperfeiçoar o desempenho. Usando-se fenóis e/ou metanol de planta transgênica como desnaturantes em vez de gasolina, pode-se reduzir custos e aumentar as alternativas de desenho do motor automotivo.

Redução do teor de Lignina. Outro modo de reduzir lignina e produtos de quebra de lignina que não são fermentáveis em hidrosilato é reduzir o teor de lignina em planta transgênica da presente invenção. Tais métodos foram desenvolvidos, e podem ser usados para modificar as plantas da invenção (vide, por exemplo, Patentes dos Estados Unidos N° 6.441.272 e 6.969.784, Pedido de Patente dos Estados Unidos N° 2003-0172395, Publicação dos Estados Unidos e WO 00/71670).

Hidrólise de Amido Combinada e Hidrólise de Material Celulolítico. As plantas transgênicass e partes de planta aqui descritas podem ser usadas em métodos envolvendo hidrólise combinada de amido e material celulósico para rendimentos aumentados de etanol. Em adição a provisão de rendimentos de etanol, este métodos podem ser realizados em facilidades de processamento de etanol baseadas em amido existentes.

O amido é um polímero de glicose que é tipicamente hidrolizado em moléculas de glicose individuais para fermentação. A hidrólise de amido

pode ser realizada na presença de um microorganismo amilolítico, ou enzimas, tais como enzimas amilase. Em certas concretizações da invenção, a hidrólise de amido é realizada na presença de pelo menos uma enzima amilase. Exemplos de enzimas amilase adequadas incluem α-amilase (que cliva aleatoriamente as ligações α(1-4)glicosídicas de amilose para produzir dextrin, maltose ou moléculas de glicose) e glucoamilase (que cliva as ligações α(1-4) e α(1-6)glicosídicas de amilose, e amilopectin para produzir glicose).

Nos métodos da invenção, a hidrólise de amido e hidrólise de material celulósico pode ser realizada simultaneamente (isto é, ao mesmo tempo) sob condições idênticas (por exemplo, sob condições comumente usadas para hidrólise de amido). Alternativamente, as reações hidrolíticas podem ser realizadas seqüencialmente (por exemplo, hidrólise de lignocelulose pode ser realizada antes da hidrólise de amido). Quando amido e material celulósico são hidrolizados simultaneamente, as condições são preferivelmente selecionadas para promoverem degradação de amido e ativar enzima(s) lignocelulósica(s) para a degradação de lignocelulose. Os fatores que podem ser variados para otimizar tais condições incluem processamento físico das plantas ou partes de planta, e condições de reação, tais como pH, temperatura, viscosidade, tempos de processamento, e adição de enzimas amilase para hidrólise de amido.

Os métodos da invenção podem usar plantas transgênicass (ou parte de planta) sozinhas ou uma mistura de plantas não-transgênicas (ou partes de planta) e plantas (ou partes de planta) transformadas de acordo com a presente invenção. Plantas adequadas incluem quaisquer plantas que podem ser empregadas na produção de etanol baseada em amido (por exemplo, milho, trigo, batata, mandioca, etc). Por exemplo, os métodos da presente invenção podem ser usados para aumentar os rendimentos de etanol de grãos de milho.

E- Fitorremediação

Conforme já mencionado acima, as plantas transgênicass da presente invenção que são geneticamente transformadas para ambas expressão de enzimas lignocelulolíticas e biomassa aumentada podem ser u-

sadas simultaneamente para produção de bioenergia e fitorremediação.

Rendimentos altos de biomassa pretendidos para bioenergia são também desejáveis na fitoremediação de metais, metalóides e radionuclídeos, porque a taxa de remoção de contaminante é uma função da biomassa, bem como da bioconcentração (a razão de contaminante nas plantas para contaminante no solo). Em adição, novos modos de disposição de biomassa contaminada são requeridos que minimizam cargas de aterro. Os métodos de tratamento atuais podem remover 60-90% de metais recuperados de biomassa de planta (Edenspace, data não-publicada), que para alguns contaminantes é insuficiente para permitir disposição da biomassa tratada como despejo não-danoso. Os metais são tipicamente seqüestrados dentro das paredes celulares, que são difíceis de quebrar com custo efetivo usando-se técnicas atuais. A celulose nas paredes de célula primária e secundária conta tipicamente 35 a 50% de peso seco de planta (B.B. Buchanan et al., "Biochemistry & Molecular Biology of Plants, American Society of Plant Physiologists", 2000, Rockville, Maryland).

A capacidade de degradar paredes celulares com celulase de baixo custo pode aperfeiçoar significantemente o estado da técnica atual na recuperação de contaminante de colheitas de fitorremediação, permitindo tratamento de biomassa contaminada para reduzir os custos e responsabilidades associadas com a disposição de aterro, capacita a reciclagem de metais recuperados, enquanto produz estoques de alimentação comercializáveis limpos. Importantemente, o custo marginal de produção de celulase e estoques de alimentação de bioenergia hidrolizados de acordo com a presente invenção, podem ser muito baixos, porque muito da produção de biomassa e custos de tratamento seriam suportados pelo projeto de fitorremediação. A necessidade de cobrir custos de crescimento de colheita e proporcionar um fazendeiro com um ganho de $150 a $200 por um acre, enquanto um desafio de custo significante para colheitas de biocombustíveis dedicadas (B.S. Hooker et al., e, "Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion", ACS Symposium Series, 2001, 769: 55-90), representa somente uma fração muito pequena de receitas de remediação ambiental de $10.000 ou mais por

acre (D. J. Glass, U.S. and International Markets for Phytoremediation, 1999-2000, 1999, pp. 12-114).

Conforme reportado nas Seções de Exemplos abaixo, as presentes Requerentes demonstraram desempenho de fitorremediação aceitável de E1 tabaco, incluindo recuperação pós-colheita aumentada de metais de biomassa de planta, e atividade de celulase normal de material com metais pesados.

C- Produção de Hidrogênio

Um relatório de fevereiro de 2002 pelo Laboratório de Energia Renovável Nacional na produção de hidrogênio de biomassa indica que a curto a médio prazo, a geração de hidrogênio de biomassa é mais praticável do que de outros processos de base renovável, tais como eletrólise acionada pelo sol ou pelo vento, ou divisão de água fotobiológica (T. A. Milne et al., Hidrogênio de biomssa: desafios de estado da técnica e pesquisa. O Laboratório De Energia Renovável Nacional, Relatório Técnico IEA/H2 - TR-02/001, 1 de fevereiro de 2002). O relatório também observa que a produção de hidrogênio de biomassa não é atualmente economicamente competitiva com vapor de gás natural que reforma hidrogênio de apenas suporte, em parte por causa do teor de energia relativamente baixo, e alto teor de oxigênio de biomassa, e sugere que um foco de pesquisa futura deve ser a indentificação e desenvolvimento de oportunidades de co-produção, visto que produtos múltiplos aperfeiçoam economias de produção pela provisão de fontes adicionais de renovação, enquanto divide custos. Um relatório de 2004 pelo National Research Council também nota a importância de oportunidades de co-produção potenciais, bem como a desejabilidde de modos de descoberta para usar resíduo de colheita tal como forragem de milho como estoque de alimentação, de modo a reduzir custos de produção de hidrogênio de biomassa de planta (National Research Council. The hidrogen economy: Opportunities, costs, carriers, and R & D, 2004, National Academies Press, Washington, DC, 101-103). Em 2004, o Advisory Committee atualizou seu plano de pesquisa recomendado, recomendando especificamente que o Departamento de Energia dos Estados Unidos e Departamento de Agricultura dos

Estados Unidos aumentam significantemente a reserva de programas de R&D celulósicos (Biomass Research and Development Technical Advisory Committee (BRDTAC), Summary Statement and Recommendations, Julho de 2004).

Conseqüentemente, em outro aspecto, a presente invenção proporciona uso de plantas transgênicass transformadas para ambas expressão de enzimas lignocelulolíticas e biomassa aumentada na produção de hidrogênio baseado em biomassa. Por exemplo, a biomassa produzida por projetos de fitorremediação de grande escala, bem como de grama, e outras colheitas de "tira de barreira" amplamente usados para reduzir escoamento de fertilizador, podem ser uma fonte significante de celulase e estoque de alimentação de bioenergia de baixo custo para produtores de hidrogênio baseada em biomassa. Pela divisão da produção de biomassa e custos de tratamento de pós-colheita com fitorremediação, os custos para produção de estoques de alimentação hidrolizados para biocombustíveis podem ser dramaticamente reduzidos, uma etapa importante em direção ao aumento do custo-competitividade de combustível de hidrogênio.

Exemplos

Os exemplos seguintes descrevem alguns dos modos preferidos de produzir e praticar a presente invenção. Contudo, deve ser compreendido que estes exemplos são para propósitos ilustrativos somente, e não são significativos para limitar o escopo da invenção. Além disso, a menos que a descrição em um Exemplo seja apresentada no tempo passado, o texto, similar ao resto do relatório descritivo, não é pretendido para sugerir que os experimentos foram atualmente realizados, ou dados foram atualmente obtidos.

Alguns dos resultados reportados nesta seção foram apresentados em manuscritos que recentemente foram aceitos para publicação (H. Salehi et al., "Delay in flawering and increase in biomass of plants expressing the arabidopsis floral receptor gene FLC (FLOWERING LOCUS C)", J. Plant Physiol., 2005, 162: 711-717; e H. Salehi et al., "Expression of flowering and tabacum L.) and its effect on delay in flowering and increase in bio-

mass", In Vitro Cellular and Development Biology - PLANT, 2005). Cada um destes manuscritos é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

Exemplo 1: Geração de Tabaco Transgênico

Para gerar o tabaco transgênico, tabaco tipo selvagem foi transformado com os genes E1 e, em seguida, AtFLC usando-se Agrobactéria tumefaciens, conforme descrito abaixo.

Descrição do Doador: O gene endo-1,4-β-glucanase E1 (Acesso no Banco de Gene N° U33212) foi isolado a partir do bactéria termofílica Acidothermus cellulolyticus. Este bactéria foi originalmente isolada de decomposição de madeira em uma reunião acídica termal em Yellowstone National Park, e depositado no American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) sob o número de coleta 43068 (A. Mohagheghi et al., Int. J. System. Baceril., 1986, 36: 435-443; Tucker et al., Biotechnology, 1989, 7: 817-820). Conforme já mencionado aqui, a bactéria foi caracterizada com a capacidade de hidrolizar e degradar celulose da planta.

Para transformação em tabaco, o domínio catalítico E1 foi isolado a partir da seqüência genômica e continha bp 950-2020 listados no N° de Acesso U33212. Para gerar a construção catalítica-E1, um códon de parada foi introduzido após a especificação de códon Val-358 de E1 através de Reação de Cadeia Polimerase (PCR) e a extremidade 5' do gene foi fundida aos 21 aminoácidos na proteína de armazenamento vegetativa de feijão-soja amino-terminal VSPβ (N° de Acesso no Banco de Gene M76980) (Zlegle-rhoffer et al., Mol. Breed, 2001, 8: 147-158) de modo a objetivar a proteína ao apoplasto. Para proposta de clonagem, um local SacI foi adicionado à extremidade 3' do gene E1 seguindo a códon de parada e um local XbaI na extremidade 5' da seqüência VSPβ.

O gene inibidor de Local de Florescimento C, ou FLC (acesso # BK000546) é um repressor dependente da dosagem de florescimento em Arabidopsis (S.D. Michaels e R.M. Amasino, Plant Cell, 1999, 11: 949-956), que opera por regulação negativamente da expressão de genes que promovem florescimento, tais como SOC1 e FT. O 591 bp cDNA foi isolado de Arabidopsis, e usado sem modificação para transformação em tabaco.

Descrição do Recipiente. O organismo recipiente foi Nicotiana tabacum W38, uma variedade comumente usada para estudos de laboratório. O tabaco é uma colheita muito caracterizada que foi cultivada por séculos.

Descrição do Vetor e do Processo de Transformação. O vetor de transformação E1 foi construído de vetor pBI121 binário Ti para transformação mediada por agrobactéria (Jefferson et al., EMBO J., 1987, 6: 3901). Através de transformação agrobacterial padrão, seqüências de DNA em entre as margens direita e esquerda são estavelmente transformadas no genoma da planta. A seqüência completa de pBO121 é 14.758 bp (N° de Acesso ao Banco de Gene AF502128), e contém resistência ao antibiótico canamicina e o gene de GUS em entre seqüência de margem direita e esquerda (conforme apresentado na Figura 1). Para o desenvolvimento de pBI121-E1, o gene β-glucuronidase foi imposto através da digestão com XbaI e SacI, e substituído com a construção VSPβ/E_1 (conforme mostrado na Figura 2).

Os explantes de folha de tabaco foram transformados com pBI121-E1 de acordo com procedimentos padrões (Horsch et al,. Sciences, 1985, 227: 1229). Os explantes de folha foram tomados a partir das segunda e terceira folhas totalmente expandidas de culturas de projeção in vitro de 3 semanas de idade de Nicotiana tabacum W38 mantida em meio de EM. Após pré-cultura, os explantes foram gotejados em uma suspensão de células de Agrobactéria contendo o vetor pBI121 modificado obtido de uma cultura durante toda a noite. As peças de folha foram selecionadas em 100 mg/L de canamicina e plantinhas (tipicamente 2 ou 3) desenvolvidas 10-14 dias depois do calo formado ao longo das bordas de folha cortadas. As plantinhas foram excisadas e enraizadas em meio de EM contendo 100 mg/L de canamicina em caixas Magenta GA7 (Ziegelhoffer et al., Mol. Breed, 2001, 8: 147-158).

As plantas transformadas foram confirmadas através de amplificação de PCR genômico do gene E1 em paralelo com medição de hidrólise de celulose usando-se extratos de folha (Ziegelhoffer et al., Mol. Breed.

2001, 8:147-158). As plantas positivas para ambas a presença do gene E1 e atividade E1 foram crescidas para maturidade, e sementes foram coletadas para operação adicional. A expressão estável do gene E1 e atividade E1 foi observada para gerações múltiplas de tabaco após o evento de transformação.

O AtFLC cDNA foi isolado de e subclonado no vetor pGreen (http://www/pgreen.ac.uk/plasmid.htm) sob o controle do promotor 35S de Vírus de Mosaico de Couve-Flor (vide Figura 3) para transformar E1 tabaco. O vetor pGreen também contém o gene bar (região de codificação de fosfinotricin acetiltransferase) para seleção do herbicida Basta em plantas transformadas em entre as seqüências de margem esquerda e direita. De modo a aumentar a biomassa de tabaco, e retardar o tempo de florescimento como um método de prevenção da transferência de pólens transgênicos para outras colheitas de campo, AtFLC foi transformado na geração T4 de E1 tabaco desenvolvido acima pelo mesmo método. As plantas transformadas foram selecionadas com 5 mg/L de amônio glufosinato, em seguida transformadas com PCR genômico e análise de RNA blot para medir o nível de expressão de AtFLC. As sementes foram coletadas a partir da linha com o fenótipo mais forte e se avolumaram para uso.

Presença de gene E1. Para verificar a presença do gene E1, a terceira ou quarta folha a partir do ápice de projeção podem ser usadas para extração de proteína. As amostras de folha podem ser colhidas em 2-3 horas no período de luz. Os tecidos de folha podem ser cortados em peças de aproximadamente cm^2, e reunidos para homogeneização. Um ensaio de enzima, SDS-PAGE, e western blot, podem ser efetuados conforme descrito anteriormente (Z. Dai et al., Transgenic Res., 2000, 9: 43-54).

Atividade E1. Para avaliar a atividade E1, a terceira e quarta folhas a partir do ápice de projeção de plantas transgênicass podem ser colhidas. Uma metade dos tecidos de folha podem ser fatiados em peças de 1 cm x 2 cm, e a outra metade usada para extração direta, conforme descrito acima. Cerca de 0,15 g de peças de folha podem ser infiltradas por vácuo com 50 mM de MES (pH 5,5) duas vezes cada por 10 minutos em (50,8 cm)

20 polegadas de mercúrio. As peças de folha infiltradas podem ser transferidas em 1,5 mL de tubos de microcentrífuga a 350 g por 10 minutos, para obter fluido a partir do espaço intracelular. Cerca de 15-25 µL de fluido intercelular podem ser usados para quantificação de proteína.

Exemplo 2: Desempenho Enzimático e Estabilidade de E1 Tabaco

As propriedades de estabilidade de concentrados de proteína de folha e atividade de E1 celulase associada em tabaco transgênico E1-FLC foram caracterizadas.

Os concentrados de proteína de folha foram preparados por maceração das folhas de tabaco com gelo em um misturador a uma razão de 8:1 (p/1). As amostras destes extratos foram analisadas para atividade de celulase usando-se carbóxi-metil-celulose. Conforme mostrado na Figura 16, o extrato a partir das plantas E1, mas tabaco tipo não-selvagem pode hidrolizar celulase. As amostras destes concentrados foram também submetidas a várias condições para determinar o efeito de refrigeração a 2°C, pré-aquecimento da amostra a 90°C, acidificação a pH 4,0 com ácido láctico, e secagem do material de planta antes da adição a celulase externa (Spezyme CP de Genencor INternational, Inc., Palo Alto, CA). Nove combinações destas variáveis foram estudadas na presença e ausência de celulase adicionada (25 µL de celulase por mL).

A estabilidade/atividade das enzimas celulase (ambas adicionadas/externas e endógenas) dentro destes concentrados foram medidas como uma função da hidrólise de produção de celulose e glicose. Alíquotas de um (1) mL de cada amostra foram adicionadas a 0,25 g de celulose microcristalina. A solução foi trazida a 10 mL em um tampão de citrato em pH 4,5. As soluções foram permitidas hidrolizarem por 5 dias, e a concentração de glicose foi medida para avaliar atividade de celulase da amostra. Estudos de longo prazo são encaminhados para determinar as medições de atividade de celulase por várias vezes por até 6 meses. A hidrólise de celulose como uma função da concentração de glicose nas amostras é apresentada na Tabela 1.

Conforme é evidente da Tabela 1, a adição de ácido limita seve-

ramente a atividade de celulase, que é muito maior a cerca de pH 4,9. Significantemente, em todos os casos, exceto aqueles envolvendo adição de ácido, a planta transgênica, mais experimentos de celulase, produzem mais glicose que o controle mais celulase. Isto é uma forte evidência para a expressão de atividade de celulase no tabaco transgênico. Algumas amostras transgênicas mostram produção de glicose mensurável mesmo sem celulase adicionada, onde nenhum dos controles mostraram tal atividade de celulase. O crescimento bacterial foi visto em todas as amostras acidificadas à temperatura ambiente após somente duas semanas, e algum crescimento foi visto em uma amostra refrigerada após um mês. Como tal, o armazenamento acidificado à temperatura ambiente é claramente inadequado para condições de armazenamento de longo prazo.

Este experimento indica que a atividade de E1 celulase em um concentrado de plantas E1 é muito estável, sugerindo que o suco da planta pode ser usado como uma fonte de celulase para hidrolizar biomassa de planta não-transgênica, ou adicionado de volta às próprias plantas transgênicass após etapas de pré-processamento tal como alto calor ou tratamento ácido são completados, que podem, de outro modo, inativar a enzima. O experimento também indica que adição de celulases a plantas E1 aumenta a produção total de glicose, comparada a adição de celulases a plantas não-transgênicas. Isto é um resultado importante, visto que ele sugere que o uso simplesmente de plantas E1 transgênicas com técnicas de celulase externa atuais pode aumentar substancialmente os rendimentos de etanol.

Conforme mencionado acima, o sistema de enzima "celulase" é complexo, e compreende várias atividades, enquanto o tabaco E1 transgênico somente expressa uma destas atividades, a saber, a endoglucanase. Três amostras no experimento descrito acima mostram evento de glicose na ausência de um complexo de celulose complexa, que é um resultado encorajador.

A adição de membros adicionais do complexo de celulase seria esperada aumentar a hidrólise de biomassa de tabaco E1. Para testar esta hipótese, uma endoglucanase, glucomilase e hemicelulase (obtidas de BIO-

CAT, Troy, VA) foram adicionadas a um tabaco não-transgênico, e a um tabaco E1-FLC. Conforme mostrado na Figura 4, os resultados indicam que a adição de tipos de enzima diferentes quase dobra a produção de glicose no tabaco transgênico, sem pré-tratamento químico. O tabaco E1-FLC foi também encontrado para produzir um nível mais alto de glicose do que o tabaco somente E1 usado no experimento prévio.

Este resultado sugere que a criação de genótipos de planta adicionais que expressam membros diferentes do complexo de celulase, tais como ligninase e hemicelulase, pode multiplicar o rendimento de hidrólise de plantas E1. O resultado também sugere que a atividade E1 não é restrita àquela de uma endogluconase. A produção aumentada de glicose na ausência de celulases externas indica que hidrólise enzimática adicional de polissacarídeos e dissacarídeos está ocorrendo em uma maneira similar àquela observada com exoglucanaes, indicando que E1 pode ser o que foi denominado uma endoglucanase "de processo".

Exemplo 3: Desempenho de Fitorremediação de Tabaco E1

Os presentes requerentes demonstraram anteriormente o uso de tabaco na fitorremediação de metais, tais como chumbo e urânio (Edenspave Systems Corporation, 2002, USEPA SBIR Phase I Report, Transgenic Citrate Synthase, Grant N° 68-D-02-018). Uma comparação de linha de base foi conduzida do desempenho de fitorremediação de cepa de tabaco não-transgênica vs. tabaco E1. Três indicadores de desempenho foram avaliados: (1) entendimento de planta (Pb), um contaminante de solo comum; (2) extractabilidade de Pb a partir da biomassa pós-colhida; e (3) efeito de Pb em tecido de planta na atividade de celulase pós-colhida.

Entendimento de Planta de Metais Pesados. O entendimento de Pb e zinco (Zn) pelo tabaco transformado foi comparado com variedades de tabaco tipo selvagem e outros em tabaco E1-FLC transformado de solo contaminado com Pb e tabaco Xanthi (não-transformado) foram semeados em potes contendo 300 g de solo com uma concentração de Pb de 800 mg/kg coletada de um local no nordeste dos Estados Unidos. As plantas foram crescidas por seis semanas em câmara de crescimento Edenspace usando-

se um ciclo de 16 horas dia / 8 horas noite. Após seis semanas, as plantas receberam aplicação de solo de um agente de indução químico para promover entendimento de chumbo antes de serem colhidas e analisadas para determinar diferenças no entendimento entre as plantas de tabaco transgênicas e de controle. Todas as plantas foram colhidas pelo corte do caule de cada planta aproximadamente 1,27 cm (meia polegada) acima da superfície do solo. As plantas foram secadas a 70°C, moídas para passarem em uma peneira de malha 20, e digeridas seguindo o Método de EPA 2050 (USEPA, 1986), seguido por análise usando-se espectrometria de plasma indutivamente acoplado (ICP) (Método EPA 6010; USEPA, 1986).

Conforme mostrado na Figura 5, o entendimento de Pb e Zn foi comparável no tabaco transformado e tabaco não-transformado, indicando que as plantas E1 podem ser usadas com sucesso para fitorremediação. Este resultado é significante porque ele suporta a possibilidade de crescimento de plantas transgênicass para fitorremediação, bem como para biocombustível, criando oportunidades para economias de custo de coprodução.

Recuperação de Metais Extraídos de Planta. A fito-extração de metais remove metais a partir do solo (matriz de aluminosilicato) e os concentram no tecido de planta (matriz lignocelulósica). A recuperação de metais a partir da biomassa para reciclagem ou disposição eficiente deve ser aperfeiçoada se a celulose pode ser efetivamente degradada para permitir fácil extração e separação dos metais a partir do tecido.

Este experimento demonstra que a aplicação de celulases exógenas à biomassa seca de fato resulta em extractabilidade aperfeiçoada de metais a partir do tecido de planta. A biomassa de planta seca de solos contendo arsênico e chumbo foi equilibrada em um tampão de citrato (pH 4,5) com celulases, hemicelulases e glucoamilase adicionadas. Para chumbo e arsênico (As), mais do que 95% da concentração de elemento foi extraível a partir da biomassa seca sem a adição de celulases, um resultado de grande importância potencial para tratamento de biomassa e disposição na indústria de fitorremediação. Acredita-se que a moagem fina (malha 20) e calor são

juntos responsáveis por esta alta taxa de extração, que é superior às taxas que os Requerentes alcançaram usando métodos de extração alternativos. A adição de celulases não tem efeito significante nesta taxa de extração já alta.

Interessantemente, conforme mostrado na Figura 6, a aplicação de celulases não aperfeiçoa a extractabilidade de metais que são nutrientes de planta, tais como ferro (Fe) e cálcio (Ca), sugerindo que estes metais foram mais vedantemente ligados na matriz lignocelulósica do que os contaminantes, tais como Pb e As. A variação no desempenho dos membros diferentes do complexo de celulase foi observada; por exemplo, hemicelulase foi mais efetiva na liberação de ferro do que cálcio, sugerindo que estes metais são ligados em formas diferentes na matriz.

A moagem mais grosseira que é mais indicativa de processos de produção prováveis será testada com a expectativa que os efeitos da celulase para extração de metal tornar-se-ão mais pronunciados a medida que o tamanho de partícula da planta aumenta.

Efeito de Metais Extraídos em Atividade de Celulase. Para determinar se as concentrações de Pb em biomassa de planta inibiriam a formação de celulase, as plantas de tabaco E1 foram crescidas em ambos solos não-contaminados e contaminados com Pb, em seguida colhidas e analisadas para entendimento de Pb, conforme descrito acima.

Conforme mostrado na Figura 7, a produção de glicose foi significantemente inferior em plantas E1 crescidas em solo contaminado com Pb. Contudo, a aplicação de celulases exógenas resulta em produção de glicose similar de biomassa seca colhida em ambos a presença e ausência de Pb. Existem várias explanações possíveis para este resultado, incluindo a possibilidade que Pb inibe atividade E1, mas não a atividade de outras celulases, e a possibilidade que a tensão da planta causada por indução quimicamente de entendimento de metal inibe a estabilidade de glicose pós-colhida e/ou atividade E1. Experimentos serão realizados para testar estas três possibilidades.

Exemplo 4: Transformação de Tabaco com FLC

Os objetivos na adição de FLC às plantas, conforme descrito na presente invenção, incluem aumentar a biomassa para aperfeiçoar o desempenho de bioenergia e fitorremediação, e retardo do tempo de florescimento como um método de prevenir transferência de pólens trangênicos para outras colheitas de campo. Conforme AtFLC não foi anteriormente expresso em tabaco, a primeira tarefa foi realizar a transformação em ambos tabaco de controle tipo selvagem e tabaco E1, e, em seguida, teste para integração e expressão bem-sucedidas de AtFLC e expressão continuada de E1 em tabaco E1.

A construção de FLC (conforme descrita no Exemplo 1) foi transferida em um vetor de Agrobactéria para transformação de um tabaco não-transgênico, e também para uma geração de T4 de um tabaco transgênico de produção de Acidothermus cellulolyticus E1 endo-1,4-β-glucanase (sementes T_1 obtidas de Dr. S. Austin-Philips, University of Wisconsin).

Transformação de um Tabaco não-E1 com FLC. Para observar os efeitos de FLC independente de E1, tabaco não-E1 foi primeiro transformado com o gene FLC. A cepa Agrobactéria GV 3101 contendo a construção pGreen foi usada para transferência do gene Arabidopsis FLC em tabaco (Nicotiana tabacum 'Samsun'). Cinco linhas transgênicas putativas foram selecionadas e examinadas para a presença de FLC. O DNA genômico e o RNA total foram isolados a partir das folhas, e usados para reação de cadeia de polimerase (PCR) e análise de manchamento de RNA, respectivamente. Ambos testes de DNA e RNA confirmaram a integração e transcrição de FLC em todas as cinco linhas e suas progenias T_1. As plantas transgênicass em uma linha mostraram uma média de 36 dias de retardo no tempo de florescimento, comparado a plantas de controle (vide Figura 8), e a média total para todas as linhas foi 14 dias de retardo. As plantas transgênicass também revelaram tamanho de folha e rendimento de biomassa aumentados, e altura reduzida no tempo de florescimento. Um manuscrito apresentando estes resultados (H. Salehi et al., "Delay in flauering and incerase in biomass of plants expressing the arabidopsis floral repressor gene FLC (FLOWERING LOCUS C)", J. Plant Physiol., 2005).

Transformação de um Tabaco E1 de Quarta Geração com FLC. A geração T_4 de tabaco transgênico de produção de Acidothermus cellulolyticus E1 endo-1,4-β-glucanase foi usada para transformação e expressão mediadas por Agrobactéria de gene de Arabidopsis thalina FLC. Aqui, a cepa de Agrobactéria GV 3101 contendo os cassetes marcadores selecionáveis FLC e bar (pGreen) foi empregada para transformação. As plantas que mostraram a integração de ambos E1 e FLC foram selecionadas usando-se marcador selecionável bar e PCR. Seis linhas transgênicas putativas E1 e FLC-positiva, resistentes a 5 mg/L de amônio glufosinato, foram selecionadas para análise molecular adicional. O RNA total foi isolado de folhas de plantas de estufa de 6 semanas de idade, e usado para a análise de manchamento de FLC RNA. O teste de RNA confirmou a transcrição de FLC em todas as seis linhas de Elcd-FLC.

Conforme mostrado na Tabela 2a, as plantas E1cd-FLC transgênicas mostraram uma média de 9 a 21 dias de retardo no tempo de florescimento comparado a plantas de controle de expressão de E1cd, e a média total para retardo no florescimento em todos os tempos foi 14 dias. Como as plantas de tabaco de somente FLC, as plantas E1cd-FLC também revelaram aumentos estatisticamente significantes no tamanho de folha e rendimento de biomassa (vide Tabela 2b). Todas as plantas E1cd-FLC transgênicas foram significantemente mais curtas do que o tabaco de controle no tempo de florescimento. Um manuscrito apresentando estes resultados (H. Salehi et al., Expression of flowering lócus C in Acidothermus Cellulolyticus endo-1-4-β-D-glucanase (E1) transgenic tobacco (Nicotiana Fobacum L.) and its effect on delay in flawering and increse in biomass", In Vitro Cellular and Development Biology-PLANT, 2005).

O retardo no florescimento demonstrado nestes experimentos, particularmente em colheitas polinizadas abertas, tal como milho, pode ser um sistema de bio-confinamento útil para reduzir a chance de contaminação cruzada de pólen transgênico com plantas reprodutoras cruzadas no campo. O aumento substancial na biomassa visto nestas três linhas do tabaco de primeira geração pode ser um traço útil para aumentar o teor de bioenergia e

desempenho de foto-remediação.

Exemplo 5: Transformação de Milho com E1-FLC

Para desenvolver um sistema para transformação de milho, arroz foi usado como sistema de planta de modelo de cereal para transferência do E1 e dos genes bar. Para se fazer isso, o pZM766R1-cat foi inserido em pCAMBIA (comprado de pCAMBIA Co (Camberra, Austrália) contendo o gene marcador selecionável bar e o gene indicador de cor gus (vide Figura 9). O plasmídeo foi obtido sob um Acordo de Transferência de Material (MTA) de Dr. K. Danna de Colorado State University. As plantas de arroz transgênico E1 mostraram a integração de todos os três trangenes (E1, bar e gus) por PCR. Além disso, eles mostraram produção de E1 mais alta do que 24% de proteínas solúveis totais e atividade de enzima do transgene E1.

Várias linhas transgênicas de milho independentes foram, em seguida, desenvolvidas usando-se bombardeio biolístico. As linhas mostrando integração, expressão, atividade enzimática e acúmulos confirmados do produto transgene dentro do apoplasto foram retidas para teste e desenvolvimento adicionais, conforme descrito abaixo.

Preparação de Explante e Bombardeio Biolístico de Milho. As Requerentes produziram projeção apical de multi-meristema primordial para bombardeio biolístico de uma mistura de construções de E1 e bar. O milho foi crescido em estufas. Os embriões imaturos foram produzidos, cultivados, e linhas de calo foram produzidas, e as linhas de calo derivadas de embrião imaturas foram bombardeadas com uma razão de 1:1 de um plasmídeo contendo o gene E1 e um dos três plasmídeos, cada um contendo o gene marcador selecionável bar.

Para o plasmídeo E1, o pMZ766E1-cat (vide Figura 9) foi selecionado porque em Arabidopsis esta construção produziu a enzima E1 até 26% das proteínas solúveis totais (M. T. Ziegler et al., Mol. Breeding, 2000, 6: 37-46). Esta construção contém o promotor e intensificador fortes, e elemento de objetivação de apoplasto. Multimeristemas de milho e as linhas de calo derivadas de embrião imaturas foram co-transformados com o pZM766E1-cat e ou o pGreen (Fig. XX0, pDM 302 (Figura 10), ou o pBY520

(Figura 11), visto que cada um tem suas próprias vantagens potenciais.

Análise de Confirmação de Milho Transgênico E1. PCR foi usado em umas poucas plantinhas selecionadas de PPT, e confirmado a presença dos genes E1 e bar. Aquelas plantinhas que mostraram sinais positivos foram selecionadas para estudos adicionais. Embora o número de cópia de E1 em plantas de milho usando o local único de gene não foi ainda determinado, a análise de Southern blot confirmou a integração estável de transgene E1 em várias linhas de milho positiva de PCR (vide Figura 12). A translação de transgene E1 em milho foi confirmada usando-se Western blot, e comparada à translação de E1 em tabaco e arroz (vide Figura 13).

Operação Preliminar na Localização de Apoplasto de E1 em Milho Transgênico. Baseado na experiência prévia com estudos de localização de outros produtos de gene (polihidroxibutirato) em milho, via microscopia confocal, um anticorpo primário E1 e um anticorpo secundário apropriado foram usados para realizar localizações de E1 em tecido de milho transgênico. Embora muitas amostras mostrem ligação não-específica forte da fluorescência conjugada aos tecidos de planta, alguns exemplos mostraram possível localização de E1 em apoplasto (Figura 14). Nenhuma das linhas de planta geradas conforme aqui descritas parecem mostrar efeitos de crescimento adversos a partir da ligação não-específica de E1 em seus tecidos. A localização aumentada de E1 em apoplasto será procurada usando-se vários agentes de bloqueio diferentes para reduzir qualquer ligação não-específica potencial.

Nível de Produção de E1. e Atividade Biológica de E1 em Plantas transgênicass.

Várias cepas de milho T_0 foram crescidas, a quantidade de enzima E1 produzida e sua atividade biológica foram medidas e comparadas com seu desempenho em um tabaco T_4 E1 e arroz T_0 E1. O desempenho entre as cepas T_0 varia devido as diferenças posicionais no ponto de inserção de E1 no genoma de milho. Na cepa, Milho 1-2, mostrou excelente produção de E1 e atividade, com E1 contando 9,07% de proteínas solúveis totais (TSP), ou aproximadamente 1% do peso seco total de milho. Em compa-

ração, uma linha de arroz produz E1 a 24,13% de TSP, e uma linha de tabaco 3,8% de TST (vide Tabela 3). A alta produtividade da linha de arroz observada no presente estudo é comparável ao resultado alcançado anteriormente em Arabidopsis, e sugere que rendimentos mais altos podem ser alcançados no milho do que aqui obtidos. Conseqüentemente, novas linhas de milho E1 serão criadas para procurar rendimentos de enzima de mais do que 20% de TSP.

Sumário dos Resultados Obtidos

Os resultados obtidos nos Exemplos aqui reportados proporcionam forte suporte para a contenção que adaptando-se os traços de planta de colheita pode-se aperfeiçoar significantemente os rendimentos de biocombustível, e reduzir os custos de produção de biocombustível. Atividade robusta por uma enzima celulase chave, E1 endonuclease, foi demonstrada em tabaco e milho transformado. Uma linha de milho E1 tem mostrado produção de E1 em mais do que 9% de proteínas solúveis totais, um nível aproximadamente igual ao nível de enzima exógena hoje adicionada a biomassa celulósica para hidrólise. Significantemente, a adição de enzimas exógenas conduziu a rendimentos mais altos de glicose de tabaco E1 do que tabaco não-transformado, sugerindo que rendimentos mais altos de etanol podem ser alcançados simplesmente pelo uso de técnicas de hidrólise de hoje nas plantas de colheita E1. Os resultados obtidos também mostraram que o gene FLC retarda o florescimento no tabaco, conforme foi anteriormente mostrado para Arabidopsis, um traço que é similarmente para ser útil no bioconfinamento de transgenes em colheitas de bioenergia. FLC pode também conferir maior biomassa. A partir do ponto de vista de co-produção de colheitas para bioenergia e fitorremediação, os presentes resultados mostraram que plantas E1-FLC podem extrair mais contaminante do que as plantas normalmente usadas na fitorremediação, e que dois dos muitos contaminantes, arsênico e chumbo, podem ser extraídos a partir da biomassa colhida em níveis excedendo 95%, facilitando reciclagem de metais, bem como uso de bioenergia a jusante dos açúcares hidrolizados.

Operação Futura

A operação futura será construída nestes resultados. As linhas E1 existentes de milho serão crescidas e reproduzidas para produzir linhas seguras, de alto rendimento, para teste de campo e produção piloto de etanol em cooperação com o Laboratório de Energia Renovável Nacional. As novas linhas de E1 serão criadas com o objetivo de impulsionar adicionalmente rendimentos de E1. Em adição, dois novos genótipos de milho serão criados, ambos tendo o gene FLC, um adicionalmente contendo uma ligninase direcionada em lignina, e a outra contendo uma hemicelulase direcionada em xylan para seguir a demonstração que combinações de tipos diferentes de enzimas celulases alcançam maior hidrólise total do que enzimas simples. Pesquisa adicional também será conduzida em como o milho transformado pode simplificar as tecnologias de processo atuais, por exemplo, pela redução de requerimentos de pré-tratamento. A continuação de experimentos de fitorremediação proporcionará informação adicional nas restrições e oportunidades de co-produção. Conforme planejado, a operação futura deve proporcionar a base para introdução de planta de colheita de multitraço com mercado potencial substancial de etanol combustível de curto prazo e fitorremediação, e cria uma infra-estrutura de produção, transporte e processamento de biomassa que é vital para criação de estoques de alimentação renováveis para a economia de hidrogênio. Mais especificamente, a operação futura incluirá os estudos descritos abaixo.

Desenvolvimento de Três Linhas de Milho Separadas de Produção de E1 Endogluconase, uma Hemicelulase e Ligninase em Níveis Maiores do que 15% da Proteína Solúvel Total (TSP)

A objetivação de celulase, hemicelulose e lignina, que juntas compreendem aproximadamente 75% de biomassa de forragem de milho, é esperada hidrolizar mais do que o dobro da biomassa lignocelulósica comparada a uma aproximação de somente celulase. Enquanto uma TSP de mais do que 4% de E1 é suficiente para hidrolizar celulose em biomassa de milho, e um nível de 10% é aproximadamente igual as taxas de condições atuais de celulases exógenas, níveis de aproximadamente 25% foram demonstrados no arroz e Arabidopsis, produzindo um objetivo de 10% a 20% em milho

em um alvo realístico. Os níveis mais altos de produção de enzima conduzirão a hidrólise mais completa, particularmente quando usados em uma "mistura" das variedades de milho onde cada variedade deve hidrolizar a lignocelulose alvo a partir de outras variedades, bem como em sua própria biomassa. Os três genótipos de milho separados, cada um produzindo enzimas diferentes, proporcionarão flexibilidade no crescimento de qualquer produção desejada de enzimas simplesmente pelo ajuste da mistura de semente na plantação.

Transformação de Milho com Genes Xilanase e Ligninase. Para maximizar a produção de açúcar a partir da biomassa, um milho de alta biomassa será transformado para produzir xilanase (usando-se um gene provido por Dr. Jonathan Walton, Michigan State Umiversity), ou para produzir uma ligninase (usando-se um gene provido por Dr. C. A. Reddy, Michigan State University). As plantas transgênicass serão testadas para integração, número de cópia, e transcrição dos transgenes, níveis de translação, atividade enzimática e localização de apoplasto de enzimas, saúde total da planta, e produção de biomassa.

Criação de Construções de Gene Xilanase e Ligninase. Duas construções de gene serão desenvolvidas, uma contendo o Cochlibolus carbomum endoxilanase (XYL1) (P.C. Apel. et al., Mol. Plant Microbe Interact., 1993, 6:467-473), e a outra contendo a Phanerochaete chrysosporium ligninase filamentosa de decomposição branca (CGL5) (H.A. de Boer et al., Gene, 1988, 69(2): 369). Cada uma conterá seqüências de cDNA reguladas pelo promotor 35S de vírus de mosaico de tabaco e intensificador, e um peptídeo de sinal de proteína relacionada a patogênese de tabaco 1a (Pr1a) para objetivar a enzima dentro do apoplasto de milho onde pH de cerca de 5,5 é ideal para estabilidade destas três enzimas (necessidade de pH de 4,8 a 5,5). Estas construções (vide Figura 15) serão similares à construção contendo o gene NREL's Acidoihermus cellulolyticus endo-1,4-β-D-glucanase (E1) (vide Figura 9) que foi usado nos experimentos apresentados nos Exemplos reportados acima. Usando-se este plasmídeo contendo E1, a produção de enzima E1 em plantas transgênicass variou de 0,1% a 25% de

TSP (uma variação que é devido a um efeito de posição) (M.T. Ziegler et al., Mol. Breeding, 2000, 6: 37-46). Conforme reportado acima, milho transgênico e arroz transgênico foram criados, que produzem até 3,8% e 24% de TSP, respectivamente.

Transformação de Milho com as Construções de Gene. Linhas de milho HI II serão crescidas para maturidade em estufas. Embriões imaturos serão coletados para produzir linhas de célula derivadas de embrião imaturo in vitro conforme descrito na transformação de milho reportada acima. As linhas de célula derivadas de embrião imaturo de milho HI II serão, em seguida, co-transformadas com cada uma das três construções acima e outra construção (pGreen) contendo o marcador de resistência de herbicida bar e os genes de Local de Florescimento de Arabidopsis C (FLC) conforme realizado para produção de milho transgênico E1 (vide acima). As plantas serão separadamente transformadas com uma razão de 1:1 de XYL1 e FLC, ou o CGL5 e FLC, de modo que cada planta transgênica expressará com a endoxilanase e FLC ou a ligninase e FLC.

As linhas de célula embriônicas serão bombardeadas com partículas de tungstênio revestidas com razão de 1:1 de cada parede de célula degradando plasmídeos, e o plasmídeo contendo genes bar-FLC, conforme descrito acima. Os explantes bombardeados serão transferidos no meio de seleção contendo 6-10 mg/L de amônio glufosinato (PPT) por outras 6-8 semanas. As células quimicamente selecionadas serão regeneradas em embriões somáticos, germinadas em plantinhas em meio apropriado contendo a mesma concentração de PPT. As plantinhas de dez (10) centímetros serão transferidas para potes, aclimatadas, e transferidas para estufas de milho Edenspace, onde elas crescerão para maturidade.

Produção de Celulase de Teste no Milho Transformado

O milho transformado será testado para produção de celulase e estabilidade sob condições de operação diferentes e pré-tratamentos.

Confirmação de Transgênese de Milho. As plantas de milho produzidas na estufa serão avaliadas para confirmar a integração, número de cópia, e transcrição dos trangenes acima conforme realizado para integração

de gene de milho transgênico E1 (Figura 12) e expressão (Figura 13), e tabaco transgênico FLC (H. Salehi et al., "Delay in flowering and increase in biomass of plants expressing the arabidopis floral repressor gene FLC (FLOWERING LOCUS C)", aceito para publicação em J. Plant Physiol., 2005, e H. Salehi et al., "Expresison of flowering locus C in na acidothermus cellulolytics endo-1-4-β-D-glucamase (E1) transgenic tabacco (nicotiana tabacum L.) and its effect or delay in flowering and increase in biomass", aceito para publicação em In Vitro Cellular and Development Biology - PLANT, 2005). A resistência à herbicida será usada como o critério de seleção inicial para transformação bem-sucedida. As plantinhas que exibem resistência à herbicida serão submetidas a caracterização adicional usando-se PCR, manchamento de Southern, manchamento de Western, e análise de manchamento de Northern.

PCR será usado para confirmar a presença de genes estranhos em plantas. Aquelas projeções/plantinhas que mostram sinais positivos serão consideradas putativmente transformadas. Para determinar os números de cópia de transgenes em plantas, o DNA genômico será isolado de plantas transgênicass putativamente crescidas em estufa e de controle (não-transformadas), em seguida análise de manchamento Southern será realizada. Uma análise de manchamento Southern usando o local único do plasmídeo determinará o número de cópias de cada transgene em plantas transgênicass. Os manchamentos de Western serão realizados para encontrar a translação de transgenes em plantas transgênicass. A translação de transgene E1 em milho já foi confirmada (vide Figura 13) e comparada à translação do mesmo transgene E1 em tabaco transgênico e arroz transgênico. Para confirmar a expressão de genes no nível de transcrição, o RNA celular total será isolado dos tecidos de planta. O mRNA que codifica o gene estranho será detectado por análise de manchamento de RNA usando as mesmas sondas usadas na hibridização de manchamento Southern, rotulado conforme acima. O mRNA será eletroforado em um gel agarose de formaldeído de desnaturação, transferido para nitrocelulose, ou filtros de nylon, hibridizado com a sonda apropriada, e, em seguida, exposto a filme de raios-X.

Após exposição do filtro contendo RNA com sonda a filme de raio-X, as faixas de hibridização serão escaneadas usando um densitômetro para determinar os níveis de mRNA específicos presentes.

Caracterização de Expressão Enzimática e Identificação de Linhas de Expressão Altas. O nível de produção de cada uma das proteínas heterólogas E1, XYL1 e CGL5 como uma fração de proteínas solúveis totais de planta, junto com a atividade enzimática de cada uma das três enzimas acima em cada linha transgênica, será determinado em uma maneira similar àquela realizada para plantas de milho transgênicas E1 acima descritas. Linhas de alta produção serão preservadas para volume futuro de semente e teste. A produção e atividade biológica de enzima E1 em plantas de milho, arroz e tabaco transgênicas foi determinada nos Exemplos acima reportados. Avaliação adicional de atividade de produção de enzima para o milho XYL1 e CGL5 transformado será realizada usando-se procedimentos providos por Drs. Walton a Reddy (Michigan State University).

Confirmação de Armazenamento de Enzima em Apoplasto de Planta. A localização de cada uma das três enzimas heterólogas acima em apoplasto de planta, a área entre a parede celular e a membrana celular (versus o cloroplasto ou vacúolo, conforme alcançado em outras plantas de celulase transgênicas) será confirmada, via o uso de cada um de seus anticorpos primários e anticorpos secundários, seguido por microscopia confocal, conforme descrito acima (vide Figura 14). Enquanto nenhum efeito adverso ao crescimento de planta de expressão E1 fosse observado em plantas transformadas de E1 geradas desse modo, a expressão de apoplasto é desejável para segregar E1 armazenado de metabolismo de planta.

Anticorpos para XYL1 e para CGL5 serão preparados para realizar manchamento de anticorpo imunofluorescente para determinar a localização do XYL1 e CGL5 em apoplasto de milho transgênico. As amostras de seção de folha transgênicas serão incubadas em uma solução contendo o anticorpo primário de cada uma das duas enzimas acima. Após lavagem para remover anticorpos não-ligados, os tecidos serão incubados no anticorpo secundário-fluoróforo conjugado (conjugado de cabra anti coelho IgG-

Alexa). Após lavagem para remover anticorpo-conjugado não-ligado, os tecidos serão montados em lâminas de microscópio, e vistos com um microscópio de florescência confocal de varredura de laser para determinar a localização destas enzimas heterólogas em plantas transgênicass.

Determinação de Produção de Biomassa e Tempo de Florescimento. Os resultados obtidos mostraram um retardo significante no florescimento e um aperfeiçoamento em produção de biomassa de planta em tabaco transformado com FLC. O nível de produção de proteína heteróloga FLC e seus efeitos no florescimento e produção de biomassa aumentada serão determinados em milho transformado. Uma linha de milho E1 de alto desempenho será usada para validar as metas de projeto em um ensaio de campo pequeno.

Produção de uma Semente de Milho T_1 (R2) E1 para Teste de Campo e de Produção. Semente para estudos de campo pequenos usando milho transformado E1 (e outras linhas transgênicas promissoras) serão obtidas usando-se plantas T1 que serão crescidas para maturidade e cruzadas e/ou purificadas em semente de volume. As plantas transgênicass serão confirmadas por classificação da resistência à herbicida, e a integridade e número de eventos de inserção de transgene serão determinados usando-se manchamentos de DNA.

Avaliação do Uso de Biomassa de Plantas Transformadas para Produção de Estoques de Alimentação e Aplicações MultiUso.

Milho transgênico e tabaco transgênico serão avaliados para uso de bioenergia, bem como para usos potenciais, tais como aplicações de fitorremediação (por exemplo, tiras de barreira, escoamento de controle, remediação de solos contaminados). Um dos objetivos principais é desenvolver uma colheita que tenha características necessárias de um estoque de alimentação de biocombustível de alto rendimento; contudo, em alguns casos, os custos de produção de colheita podem ser influenciados com aplicações, tais como fitorremediação, que proporciona benefícios adicionais. Conforme mostrado nos Exemplos acima, um tabaco E1-FLC foi desenvolvido, que tem a capacidade de funcionar como uma colheita de fitorremedição

para chumbo, bem como expressar níveis significantes de atividade de E1. Em adição, o acúmulo de chumbo na biomassa foi observado para resultar em supressão moderada de produção de glicose em plantas transformadas E1 na ausência de celulases externas aplicadas. Contudo, quando celulases externas foram adicionadas, produção de glicose foi observada para ser similar àquela de plantas não-transformadas. O potencial de uso do tabaco transformado e milho transformado será adicionalmente avaliado.

A semente de tabaco transformado e milho transformado (obtida conforme descrito aqui), e uma variedade de milho convencional, serão semeados em solo contaminado com chumbo de um local em Baltimore, Maryland, e em mistura e crescimento em pote na câmara de crescimento e estufa em Edenspace. As plantas serão crescidas por dez (dez semanas antes da colheita). Uma semana ante da colheita, metade das plantas que cresceram em cada solo receberá uma aplicação de solo de ácido cítrico para aumentar o entendimento de Pb e outros metais no solo. A biomassa, em seguida, será colhida e dividida em duas subamostras para cada combinação de tratamento. Uma subamostra de biomassa de cada tratamento será secada a 70°C e moída para passar em uma peneira de malha 20 usando um moinho Wiley. As sub-amostras de biomassa remanescentes serão homogeneizadas individualmente em um misturador com água em uma razão de planta (peso fresco):água de 1:2. A suspensão será, em seguida, filtrada, para remover sólidos grosseiros, e o extrato resultante usado para análise de atividade de E1 (produção de glicose).

Avaliação da Produção de estoque de Alimentação. A quantidade e qualidade (adequabilidade de fermentação) de açúcares produzidos pelas plantas intensificadas serão comparadas a açúcares produzidos por plantas convencionais usando-se celulase e misturas de hemicelulase comercialmente disponíveis. Os extratos e biomassa de planta seca serão incubados com um tampão de ácido cítrico (pH 4,5) a 50°C por 24 horas e 48 horas na presença e ausência de celulase e misturas de hemicelulase adicionadas. O teor de açúcar dos extratos resultantes será, em seguida, determinado usando-se HPLC para avaliar atividade de celulase.

Determinação do efeito de entendimento de metal em atividade de celulase. Os extratos de planta e biomassa de planta seca serão analisados para Pb e outros metais antes da incubação com as celulases adicionadas. Após incubação, os extratos serão filtrados a 0,45 µm e analisados para metais totais para determinar o efeito de atividade de celulase na liberação de metais a partir da biomassa de planta, bem como quantificar qualquer redução na atividade de celulase como um resultado de entendimento de metal pela planta.

Produção de Escala de Campo de uma Colheita de Biocombustível

Um local foi selecionado para hospedar a demonstração conduzida por Edenspace. A demonstração de campo será realizada sob uma permissão de USDA APHIS. Edenspace tem obtido tais permissões para outra operação de campo com plantas transgênicass. O local será selecionado em uma maneira para isolar milho experimental especialmente de quaisquer relativos selvagens, ou outras colheitas de milho, uma colheita de armadilha de pólen não-transgênica de 3 m de largura será plantada ao redor das plantas experimentais, e os locais serão visitados periodicamente por um ano após colheita para assegurar que nenhuma planta sobreviveu à demonstração.

Baseado nas provisões de permissão de APHIS, um local de demonstração de 92,90 m^2 (10.000 pés quadrados) será preparado (com uma área de tampão apropriada), fertilizado e semeado com um milho transformado E1-FLC (ou outras linhas promissoras), controle (tipo selvagem), e uma variedade existente de alto amido de milho. A área de canteiro será semeada com o genótipos selecionados e crescida por uma estação total para maturidade. Os parâmetros de crescimento, tais como taxa de germinação, população de planta, dias para florescimento, rendimento de grão, e rendimentos de biomassa total, serão monitorados para cada um do genótipos.

Na maturidade, mas antes do envelhecimento, o grão e biomassa remanescente (forragem) serão colhidos e segregados para cada um dos

genótipos. Amostras representativas de biomassa e grão serão analisadas para teor total de amido, açúcares e celulose.

Teste de Rendimento de Etanol do Milho Transformado na Facilidade de Produção Piloto do NREL

O Centro de Bioenergia Nacional no Laboratório de Energia Renovável Nacional, (NREL) concordou em auxiliar esta parte do projeto com avaliação de produção de etanol usando milho intensificado em sua facilidade de Planta Piloto de Bioetanol em Goldem, Colorado. Três linhas de milho (milho transformado (por exemplo, milho E1-FLC); milho de controle tipo selvagem, e milho de controle não-transformado) serão cada crescidas em canteiros de teste, produzindo três tipos de amostra de biomassa. Cada uma destas amostras de milho serão usadas conforme descrito abaixo.

Comparação de Rendimentos de Etanol de Biomassa Transgênica para aquelas Obtidas de Celulase Exógena Aplicada a Biomassa de Controle. Aproximadamente 2,5 kg de biomassa de peso fresco, excluindo grão, de milho transformado (por exemplo, milho E1-FLC) crescidos em solo não-contaminado (Amostra Tipo 1) serão moídos em malha 10. Água será adicionada para trazer o volume total da pasta fluida para 5 L. A pasta fluida será colhida no vaso de produção piloto à uma temperatura de 50°C por 48 horas. Microorganismos de fermentação serão, em seguida, adicionados, com o calor reduzido para 40°C por um período de 48 horas. Durante o período total de 96 horas, amostras de 10 mL serão tomadas em intervalos de 6 horas para análise de composição de açúcar hexose e pentose, e análise de etanol.

Este procedimento será repetido para Amostras 2 e 3, mas com milho de controle tipo selvagem, e milho de controle não-transformado, uma celulase externa (Celluclast™) será adicionada em t=0.

O resíduo de pasta fluida será secado e pesado para determinar qual proporção da biomassa permanece após processamento. Os resultado serão analisados para comparar o desempenho de milho transgênico e não-transgênico com relação a produção de etanol.

Avaliação de Rendimento de Etanol de Biomassa Transgênica a

qual Celulase Exógena foi Adicionada. Seguindo o procedimento acima, milho transgênico (por exemplo, milho E1-FLC) a partir do local de teste (Amostra 1) será processado junto com Celluclast. O rendimento de etanol será comparado a rendimentos a partir do milho transgênico somente, e processos de somente Celluclast.

Avaliação de Rendimento de Etanol de Biomassa Transgênica Combinada com Biomassa de Controle. Seguindo o procedimento acima, 1,25 kg de milho transgênico de peso fresco (por exemplo, milho E1-FLC) a partir do local (Amostra 1) serão combinados com 1,25 kg de peso fresco de milho de controle (Amostra 2), e processados com a adição de celulase exógena. Os resultados obtidos permitirão determinar a extensão para qual os níveis de produção alvos de enzima (por exemplo, E1) (20% de TSP) na biomassa transgênica (por exemplo, E1-FLC) são suficientes para hidrolisar celulose em biomassa adicionada não contendo a enzima (por exemplo, E1).

Avaliação de Rendimento de Etanol de Hidrólise e Fermentação Simultâneas. Seguindo o procedimento acima, milho transgênico (por exemplo, E1-FLC) a partir do local (Amostra 1), incluindo semente de milho moída seca, será processado junto com duas enzimas amilase (α-amilase e glucoamilase). Isto será repetido para milho de controle a partir do local não-contaminado (Amostra 2). Os resultados serão comparados para demonstrar a capacidade de co-processar biomassa lignocelulósica e amido.

Avaliação dos Efeitos de Pré-Processamento em Desempenho de Celulase. NERL realizará um estudo de classificação inicial de estoque de alimentação de biomassa celulósica suprida de Edenspace. Esta operação investigará uma variedade de condições de pré-processamento com o intuito de identificar condições que maximizam os rendimentos (isto é, conversão de material polimérico em açúcares monoméricos). NREL processará amostras no ambiente e condições de temperatura e pressão mais altas, e avaliará os rendimentos em experimentos de frasco sacudido, e avaliará a atividade enzimática antes e após pré-processamento.

Avaliação da Capacidade de Aplicação de Ligninase e Hemicelulase para Substituir Pré-Tratamento Químico/Calor. Baseado nos resulta-

dos das avaliações aqui descritas, NREL conduzirá teste de desempenho em fermentadores de escala de bancada de 5L para gerar resultados de desempenho voltados para dados de equilíbrio de material rigorosos. O material suficiente para esta operação será produzido naquelas condições que maximizam rendimentos de conversão nos experimentos de frasco previamente sacudidos. Os resultados de conversão com o pré-tratamento, em seguida, serão comparados a resultados usando ligninase e hemicelulase contendo milho como um substituto para pré-tratamento.

Avaliação de Desempenho Econômico

Uma estimativa preliminar do custo de produção de etanol a partir do milho intensificado será preparada. Os fatores a serem avaliados incluem diferenciais de custo em celulases exógenas, métodos de pré-tratamento, métodos de fermentação e outros métodos de produção e cultivo de planta, junto com diferenciais de rendimento de etanol. A recomendação de integração de plantas transgênicass nas facilidades de produção de etanol existentes será provida, junto com recomendações para uso futuro das técnicas na produção de combustível de hidrogênio.

Exemplo 6: Co-Processamento de Material Celulósico e Amido para Produção Aumentada de Etanol

Antecedentes. Nos Estados Unidos, etanol combustível é produzido através da fermentação de glicose a partir do amido em grão de milho, mas o suprimento limitado de grão e competição de usos para alimento e alimentação de animal restringirão o crescimento futuro na produção de etanol a partir desta fonte. A presente invenção proporciona um método de aumentar os rendimentos de etanol a partir de grão de milho fazendo com que o milho expresse enzimas celulase, facilitando a hidrólise de material celulósico no grão em açúcares fermentáveis. A produção de enzimas no grão oferece vantagens potenciais sobre a tecnologia de manufaturamento atual, incluindo custo variável baixo para as enzimas, e excelente mistura das enzimas e substratos celulósicos. A completação bem-sucedida deste projeto pode produzir um adicional de 1,1 bilhão de galões de etanol a partir do grão de milho anualmente até 2012. Este projeto também se vale da aplicação

mais ampla desta aproximação de "enzima de endoplanta" para fontes muito maiores de biomassa celulósica que incluem forragem de milho, grama e outras colheitas de energia renováveis.

Nos Estados Unidos, o etanol é produzido de grão de milho, que é principalmente produzido de amido, um polímero de glicose que é facilmente hidrofilizado em moléculas individuais de glicose para fermentação (leveduras podem, em seguida, serem usadas para converter a glicose em etanol através de fermentação de álcool). Existem dois métodos de grande escala para conversão de grãos de milho em etanol, os processos de moagem-úmida e moagem seca. Os moinhos úmidos processam os grãos por moagem úmida, fracionando-os em amido, óleo, fibra, e componentes de proteína (M.R. Ladisch and J.A. Swarczkopf, Biores. Technol., 1991, 36: 83-95; e M. Gulati et al., Biores. Technol., 1996, 58: 253-264). Enquanto somente a fração de amido é usada para etanol, os outros componentes são usados para produzirem produtos valiosos tais como alimentação de animal e óleo de milho. Na moagem seca, o milho inteiro é moído a farinha, e processado junto para produzir etanol através de uma série de etapas. O grão de milho é moído e liquefeito, liberando o amido no grão, que é, em seguida, hidrolisado e fermentado para produzir etanol e grãos de destiladores secos usados como alimentação de animal (M.R. Ladisch and J.A. Swarczkopf, Biores. Technol., 1991, 36: 83-95; and M. Gulati et al., Biores. Technol., 1996, 58: 253-264). Em 2000, aproximadamente 54% da produção de etanol nos Estados Unidos é proveniente de moinhos úmidos (M. Graboski, "Fossil Energy Use in the Manufacture of Corn Ethanol", Preparado por National Corn Grower's Association, 2002), mas o processo de moagem seca é um processo tecnicamente mais simples para produção de etanol, e uma instalação de moagem seca é menos custosa de se construir (V. Singh and S. Eckhoff, Cereal Chem., 1996, 73:716-720). Conseqüentemente, a maioria das instalações de etanol atualmente em construção são instalações de moagem seca, e até 2012 80% do etanol produzido nos Estados Unidos serão de instalações de moagem seca (M. Graboski, "Fossil Energy Use in the Manufacture of Corn Ethanol", Preparado por National Corn Grower's Asso-

ciation, 2002).

Conforme aqui reportado, as presentes Requerentes demonstraram que plantas de tabaco que expressam E1 produzem níveis mais altos de glicose quando incubadas em temperaturas que ativam E1. Enquanto o objetivo de projetar enzimas celulases em plantas é converter diretamente a biomassa transgênica em glicose, as plantas transgênicass podem também serem usadas como uma fonte de celulase que pode ser adicionada à outra biomassa de planta para hidrólise de celulose. Enquanto a maioria do grão de milho é produzida de amido, a casca de grão é principalmente celulose. Além de tudo, aproximadamente 9% da biomassa em grãos de milho é material celulósico (4% de celulose, 5% de hemicelulose) (M. Gulati et al., Biores. Technol., 1996, 58: 253-264), e pode ser eficientemente hidrolisada por tratamento de ácido diluto (B. Dien et al., J. Industrial Microbiol. Biotech., 1999, 22: 575-581), ou enzimas celulase para proporcionar açúcares glicose e pentose adicionais para fermentação (D. Irwin et al., Appl. Microbiol. Biotech., 2003, 61: 352-358), e aumenta os rendimentos de etanol (V. Singh et al., ASAE/CSAE Meeting Paper N° 046056, 2004, St. Joseph, MI). Em adição, a celulose em grãos de milho é um estoque de alimentação atrativo porque quase não existe lignina para blindar a celulose de hidrólise enzimática.

Resultados Preliminares e Objetivos Técnicos. Nos experimentos preliminares, as presentes Requerentes investigaram se a planta que produziu enzima E1 será útil na conversão da celulase em grãos de milho em glicose usando extratos de tabaco de E1. Grãos de milho tipo selvagem secados e moídos em malha 20 foram incubados com extrato de tabaco de E1 a 65°C para ativar a enzima E1. A análise por cromatografia de íon acoplada com análise de carboidrato identifica altas concentrações de açúcar presentes na solução de grão de milho após incubação que não estavam presentes em amostras incubadas com os extratos de tabaco tipo selvagem não contendo E1 (vide Figura 17(a)). O pico de glicose na amostra de milho incubada com extratos de E1 é marcantemente maior do que o pico encontrado na amostra de milho incubada com extrato de tabaco tipo selvagem, embora a amostra tipo selvagem contenha pequenas quantidades de um

açúcar não-identificado. A pequena quantidade de glicose produzida a partir dos grãos de milho incubados com extrato de tabaco tipo selvagem por 24 horas não foi apreciavelmente maior em grãos incubados em um tampão de citrato (Figura 17(b)). A celobiose de dímero de glicose foi esperada ser observada como funções de E1 endoglucanase por clivagem aleatória de ligações de β-1,4-glicosídicas que ligam moléculas de glicose a celulose. Contudo, E1 não cliva eficientemente a ligação glicosídica que liga duas moléculas de glicose juntas, deixando um nível significante de celobiose intacto. Para maximizar o rendimento de glicose neste experimento, uma celobiose microbial (Novo 188, Novozymes) foi adicionada ao E1 e extratos de tabaco tipo selvagem para hidrolisar celobiose em glicose.

Para evitar etapa de processamento extra de adição de celulases externas para hidrolisar a celulose em grãos de milho, é mais eficiente produzir as enzimas diretamente nos grãos de milho. As presentes requerentes desenvolveram linhas de milho transgênicas que expressam a enzima E1 sob o controle de um promotor constitutivamente ativo. A análise de Western blot mostrou claramente a presença de proteína E1 em tecido de milho de linhas múltiplas (Figura 13, raias 1, 2, 5 e 6, painel superior), e devido à natureza do promotor que direciona expressão do transgene de E1, é também esperado ser expressa e acumulada nos grãos.

A celulose no grão de milho é um estoque de alimentação mais atrativo do que muito da biomassa lignocelulósica devido a sua ausência de lignina, e ao fato que os custos de colheita e processamento podem ser divididos com a produção de etanol existente de amido em grão de milho. O potencial de aumento de rendimentos de etanol de grão de milho foi demonstrado com um rendimento de 2,84 galões de etanol por alqueire de milho quando a celulose foi processada com amido, conforme comparado com um rendimento de 2,58 galões/alqueire; de amido (V. Singh et al., ASAE/CSAE Meeting paper N° 046056, St. Joseph, MI, 2004, ASAE), para um aumento de 10% no rendimento. Uma instalação de etanol de tamanho médio pode produzir na ordem de 100 milhões de galões de etanol em um ano. Se a fração de celulose nos grãos de milho é também capaz de ser converti-

da em glicose e, em seguida, fermentada a etanol, uma adição de 9 milhões de galões de etanol pode ser produzida cada ano, assumindo-se uma eficiência de 80% de conversão (M. Gulati et al., Biores. Technol., 1996, 58:253-264). Além disso, pela utilização da celulose para produzir etanol, os grãos destiladores secos com solúveis (DDGS) terão uma fibra inferior e teor de proteína e gordura mais alto, tornando-os mais valiosos. Os benefícios devem ser de interesse significante para etanol em co-ops e produtores de milho, visto que a produção aumentada de etanol conduzirá a renovações significantes em pouco custo adicional ao produtor se os preços do etanol continuam a permanecer em torno do preço atual de $2,90 um galão, conforme reportado em 4 de junho de 2006. Em adição, o uso de colheitas de milho contendo celulases para aumentar rendimentos de etanol por também se utilizar celulose no grão de milho proporcionará um primeiro mercado importante para colheita aumentada projetada para produção de etanol celulósico.

Um dos objetivos técnicos para suportar este projeto é demonstrar hidrólise de celulose em grão de milho projetado para expressar E1 endonuclease. Dados preliminares usando-se extratos de E1 de tabaco indicam que a enzima E1 tem a capacidade de hidrolisar a fração de celulase em grãos de milho. As linhas de milho transgênicas foram geradas para expressarem E1 sob o controle de um promotor constitutivo, acumulando a enzima no grão, bem como no resto da planta. Estas linhas de milho E1 serão testadas para conversão de celulose no grão de milho em glicose.

Outro objetivo técnico é alcançar um aumento de 4% no rendimento de glicose pela combinação de hidrólise de celulose e hidrólise de amido em milho de E1. O grão de milho de E1 será processado sob condições padrões para hidrólise de amido no processo de moagem seca. As variáveis de tratamento incluem processamento físico do grão (por exemplo, tamanho de malha da partícula), e condições de reação, tais como pH, temperatura, viscosidade, tempos de processamento, e adição de enzimas amilase para hidrólise de amido. Os resultados bem-sucedidos demonstrarão que a celulose em grãos de milho pode ser processada diretamente com a fração de amido, conforme oposto a ser inicialmente fracionada como no

processo de moagem seca e, em seguida, hidrolisada separadamente, produzindo um aumento alvo no rendimento de glicose de 4% em comparação a grãos tipo selvagem. Esta demonstração é chave para ilustrar que a produção de glicose a partir da celulose de grãos de milho pode ser incorporada relativamente facilmente no processo de moagem eco.

Outro objetivo técnico é produzir etanol de ambos os componentes de celulose e amido nos grãos de milho de E1. A glicose produzida a partir da digestão de celulose e amido em grãos de milho será usada em uma reação de fermentação de escala de laboratório para sintetizar etanol. Ambos os efeitos positivo e negativo de subprodutos de hidrólise de celulose, tais como açúcares pentose, no rendimento de etanol, serão determinados.

Mais especificamente, operação adicional incluirá o seguinte:

1. Caracterização do nível de produção de glicose de celulose em grãos de milho de E1 de tratamento celulósico

Confirmação da atividade de E1 de extratos de grão de milho in vitro. A atividade de celulase E1 foi demonstrada in vitro em extratos de tabaco E1 transgênico e folhas de milho de E1. Os grãos de milho de E1 não foram ainda analisadas devido à necessidade imediata de avolumar as sementes das linhas de milho transgênicas, mas plantas de milho transgênicas estão atualmente crescendo e proporcionarão grão suficiente para estas análises. Carbóxi-metil-celulose (CMC) é uma molécula de celulose sintética que é comercialmente disponível e comumente usada para analisar atividade de celulase (P. Beduin. Biochem., 1983, 131: 333-336) em conjunto com Congo red, um corante que liga celulose. Quando CMC é incorporada em placas de agar em placas de Petri, as celulases podem ser aplicadas à placa que degradará a CMC. Estas áreas de degradação podem ser claramente vistas por sua falta de manchamento vermelho quando incubadas com Congo Red. Os grãos de milho de E1 serão colhidos de espigas de milho de modo que cada linha pode ser analisada separadamente. As espigas de milho serão secadas a 40°C em, em seguida, os grãos removidos e moídos em malha 20. Os extratos a partir de três amostras de 100 mg de grãos de milho

de E1 serão ensaiados em placas de CMC a 70°C para atividade de celulase, e todas as linhas que demonstram atividade de celulase serão usadas para caracterização adicional. As linhas de milho individuais já foram analisadas para níveis de expressão de proteína E1, e os níveis de atividade de celulase serão comparados com a expressão de proteína para investigar se existe uma correlação direta entre os níveis de enzima e atividade de celulase.

Análise de rendimento de glicose de milho de E1. Conforme sugerido pelos resultados preliminares mostrando que os extratos de tabaco de E1 aumentam os rendimentos de glicose dos grãos de milho (Figura 17(b)), a incorporação da E1 endoglucanase nos grãos de milho é prognosticada para aumentar a recuperação de glicose. Esta hipótese será testada pela medição dos níveis de glicose após os grãos de milho moídos terem incubado em tampão de citrato, pH 5,0 a 80°C por 24 horas. A glicose será medida espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 400 nm usando um kit de teste comercial (Raichem), e através de cromatografia de íon (Metrohm), que pode também medir os produtos de degradação de celulose. Os grãos de milho transgênicos serão comparados com os grãos tipo selvagem como um controle negativo e com celulase AN, um coquetel de celulase comercialmente disponível (Novozymes) incubado sob a temperatura recomendada de 55°C. Condições tais como temperatura e tempo de incubação serão investigadas para identificar condições que produzem o rendimento otimizado de glicose.

2. Determinação de produção de glicose combinada de celulose e amido em grãos de milho de E1

Determinação de atividade de E1 sob condições típicas de reação para hidrólise de amido. O benefício antecipado de milho transgênico que expressa E1 vem da hipótese que a biomassa celulósica pode ser processada sem modificações significantes nas condições de reação de hidrólise de amido existentes. As presentes Requerentes determinarão as condições de reação de escala de bancada otimizadas e requerimentos de estoque de alimentação necessários para a sacarificação de amido. As presen-

tes Requerentes, em seguida, determinarão o modo otimizado de incorporar a etapa de incubação de celulase no processamento de amido, que pode envolver modificação das condições de reação de celulase. Estas condições serão explanadas usando-se grãos de milho de E1 como o estoque de alimentação para determinar a quantidade de glicose que pode ser produzida a partir da celulose nos grãos de milho. A produção de glicose será medida espectrofotometricamente e por IC. Para investigar se amido e celulose podem ser hidrolisados simultaneamente, os grãos de milho de E1 serão incubados sob condições otimizadas para atividade de amido amilase, que estão tipicamente em uma temperatura e pH mais altos do que as condições otimizadas de E1, e os níveis de glicose medidos.

Medição de níveis de glicose de grãos de milho de E1 tratados para hidrolisar ambos celulose e amido. O amido no grão de milho é hidrolisado em instalações de etanol usando-se uma combinação de glucoamilase e enzimas α-amilase. Se os resultados obtidos indicam que E1 é incapaz de funcionar sob as condições de reação otimizadas para hidrólise de amido, em seguida a celulose em grãos de milho será hidrolisada antes do tratamento de amilase para evitar possível desnaturação de E1 na temperatura mais alta. Em seguida a incubação dos grãos de milho moídos sob as condições determinadas, conforme anteriormente descrito, a α-amilase será adicionada à reação e após a α-amilase ser completa, glucoamilase será adicionada para completar a digestão de amido. Se os resultados obtidos indicam que a enzima E1 pode funcionar efetivamente sob as condições de reação necessárias para hidrólise de amido, em seguida os grãos de milho suportarão somente as etapas de incubação necessárias para atividade de amilase. Os grãos de milho E1 serão usados como um estoque de alimentação para avaliar o rendimento de glicose obtida de utilização de ambos amido e celulose como fontes de glicose. O uso da enzima E1 endógena será comparado com a adição de enzimas AN de celulase externa e o nível basal de produção de glicose de grãos de milho tipo selvagem sem a presença de celulases.

3. Produção de etanol de grãos de milho de E1 em uma escala

de bancada.

Para confirmar que celulose em grãos de milho de E1 pode ser convertida em glicose sem interferência sem processos a jusante para sintetizar etanol, a biomassa a partir dos grãos de milho de E1 será usada para produzir quantidades de escala de laboratório de etanol. Em seguida a quantificação de glicose de grãos de milho de E1, a solução restante será autoclavada, e, em seguida, incubada em um sistema de fermentação anaeróbica com um inóculo de Saccharomyces cerevisiae para converter a glicose em etanol. As amostras a partir da reação de fermentação serão removidas após 48 horas e concentrações de etanol determinadas espectrofotometricamente usando-se álcool dehidrogenase (L. Kristoffersen et al., J. Anal. Tox., 2005, 29: 66-79). Na presença de etanol, a enzima de álcool dehidrogenase reduz nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) em NAHD, que pode ser medida espetrofotometricamente a 340 nm.

A operação futura também incluirá: (1) classificação de linhas de milho múltiplas para expressão de celulase e hemicelulase altas; (2) demonstração de um aumento total de 9% em rendimento de etanol sobre produção de moinho seco atual pela combinação de traços de celulase e hemicelulase em grão de milho; (3) investigação da possibilidade de uso de espigas de milho como uma fonte de material celulósico; (4) condução de um ensaio de campo com o milho projetado para demonstrar bons rendimentos de grão sob condições de campo, e avolumamento do grão para processamento subseqüente; e (5) teste de semente de milho projetada para rendimento de etanol sob condições de processamento de moinho seco.

Exemplo 7: Conversão de Glicose Aumentada de Biomassa Transgênica

Amostras de E1 e tipo selvagem foram secadas com ar a um teor de umidade de 16% e, em seguida, subconjuntos da biomassa foram pré-tratados com AFEX (isto é, Ammonia Fiber Explosion) de acordo com técnicas padrões. As amostras não-tratadas e tratadas com AFEX suportaram reação de hidrólise concorrente com a adição das enzimas celulase exter-

nas, Spezime e Novo 188. As reações foram incubadas a 50°C por 24 horas antes da determinação dos níveis de glicose presentes.

Os resultados são apresentados na Figura 19. Os níveis aumentados de glicose foram observados de hidrólise de biomassa de tabaco transgênico que expressa a E1 endoglucanase comparada com a biomassa tipo selvagem. O tabaco de E1 não-tratado produz um nível maior de glicose comparado à biomassa tipo selvagem (6,0 g/L vs. 2,9 g/L). O nível de glicose produzida de tabaco de E1 não-tratado foi similar àquele de biomassa tratada com AFEX, sugerindo que a incorporação de enzimas celulase pode diminuir ou eliminar a necessidade de pré-tratamento químico (explosão de fibra de amônio).

Exemplo 8: Seqüências de Gene de Códon Otimizadas para Expressão de Celulases Microbiais em Plantas

Conforme já mencionado acima, um método foi desenvolvido para modificar genes microbiais para expressão aumentada em plantas. Uma tabela de uso de códon de planta composta foi construída a partir da análise dos genomas seqüenciados de Zea mays, Arabidopsis thaliana, e Nicotiana tabacum. O uso de códon de cada um daqueles genomas foi dividido proporcionalmente para obter um uso de códon composto de plantas monocot e dicot, e esta tabela composta foi usada como um gabarito para modificar seqüências de DNA microbial de modo que as seqüências microbiais têm um uso de códon melhor adequado para expressão em plantas.

Para expressão transcricional aumentada da E1 endoglucanase a partir do Acidothermus cellulolyticus (número de acesso U33212) em plantas, a seqüência microbial do gene foi otimizada usando uma tabela de uso de códon de planta composta. Os usos de códon médios em Zea mays e Arabidopsis thaliana foram obtidos de Kazusa Códon Usage Database (http:/www.kazusa.or.jp/códon/), e divididos proporcionalmente juntos para produzir a tabela de uso de códon de planta composta. Com a otimização, a seqüência de E1 usada para transformação em plantas tem SEQ ID NO.1 conforme segue:

ATGGGCTTCGTTCTCTTTTCTCAACTCCCCTCCTTCCTTCTCGTTTCTACTCTTC
TTCTGTTCCTCGTAATCTCACATTCATGTCGCGCCGCAGGCGGTGGTTATTGG
CATACTTCCGGCAGAGAGATACTTGACGCTAACAACGTTCCCGTACGCATCGC
TGGTATTAATTGGTTTGGTTTCGAGACGTGCAATTATGTCGTTCACGGTCTTTG
GTCTCGCGATTACCGTTCAATGCTGGATCAAATAAAATCTCTCGGCTACAATA
CAATTCGCCTTCCCTACTCGGATGATATCTTGAAACCAGGTACTATGCCCAAC
TCAATTAATTTTTATCAAATGAATCAAGACCTTCAAGGCCTGACATCCCTTCA
AGTTATGGACAAGATAGTTGCTTACGCAGGACAAATAGGACTTAGGATTATT
CTCGACAGACACAGACCCGACTGCTCTGGCCAAAGCGCTCTCTGGTATACTTC
ATCCGTCAGTGAAGCTACCTGGATCTCTGATCTTCAAGCACTTGCCCAACGTT
ACAAAGGAAACCCTACTGTTGTTGGTTTCGATCTTCACAACGAACCTCACGAT
CCCGCCTGTTGGGGCTGCGGAGACCCATCTATTGACTGGAGATTGGCCGCCG
AACGTGCTGGCAACGCAGTGCTGTCCGTAAATCCCAACCTGCTTATATTTGTC
GAAGGCGTACAATCCTATAATGGTGACTCCTATTGGTGGGGCGGAAACTTGC
AAGGCGCAGGACAGTATCCAGTTGTCCTCAATGTCCCGAATCGTCTCGTTTAC
TCAGCACACGACTACGCTACTTCCGTATACCCGCAAACTTGGTTCAGCGACCC
GACATTCCCAAATAACATGCCCGGTATCTGGAATAAAAATTGGGGTTATCTCT
TCAACCAAAACATCGCGCCCGTTTGGCTTGGAGAATTCGGCACTACTCTGCAA
TCGACTACAGACCAAACTTGGCTCAAGACTCTTGTCCAGTACCTCAGACCTAC
AGCACAATACGGAGCAGACTCATTTCAATGGACATTTTGGTCCTGGAACCCG
GATTCTGGCGATACTGGCGGTATTCTTAAAGATGATTGGCAAACTGTTGACAC
TGTCAAGGACGGCTACCTCGCACCTATCAAATCCTCGATATTCGATCCAGTTG
GC

Os genes que codificam família putativa de 48 glicosídeo hidrolases (número de aceso YP872376) e família de 10 enzimas glicosídeo hidrolase (número de acesso YP871941), que foram identificados a partir do seqüenciamento do genoma Acidothermus cellulolyticus, foram também otimizados por códon para expressão transcricional aumentada em milho. Após otimização usando a tabela de uso de códon média para Zea mays, a seguinte seqüência (SEQ ID NO.2) para a família de 48 enzimas foi usada para expressão em plantas:

ATGCCCGGCCTCCGAAGACGCCTGAGAGCTGGAATCGTGAGCGCGGCTGCAC
TTGGGTCTCTGGTCTCTGGGCTCGTCGCTGTCGCGCCCGTCGCCCACGCCGCT
GTTACGTTGAAAGCACAATATAAGAATAATGATTCCGCCCCCTCCGACAATC
AGATTAAGCCTGGACTCCAGCTTGTGAATACTGGTTCTTCCTCAGTTGATCTC
TCAACGGTCACTGTAAGGTACTGGTTTACTCGTGATGGCGGTTCATCAACGCT
CGTGTACAATTGCGACTGGGCCGCGATGGGCTGCGGTAACATCCGCGCGTCA
TTCGGATCAGTTAACCCTGCCACGCCCACTGCCGACACGTACCTGCAGCTGTC
CTTCACTGGTGGCACACTGGCTGCAGGAGGCTCTACTGGCGAAATCCAAAAC
CGGGTGAACAAGAGCGATTGGTCTAACTTCGATGAGACCAATGACTACTCTT
ATGGCACTAACACCACTTTCCAGGATTGGACTAAGGTAACCGTGTACGTGAA
TGGTGTCCTCGTCTGGGGAACAGAACCGTCAGGAGCTACCGCATCCCCTTCAG
CTTCAGCTACTCCTTCGCCATCCAGCTCGCCGACAACAAGTCCATCTTCATCT
CCCAGTCCAAGCAGTTCACCTACGCCAACACCTTCCTCAAGTTCTCCACCCCC
ATCCAGCAATGATCCATATATTCAAAGGTTTCTCACCATGTACAACAAGATTC
ACGATCCAGCCAACGGCTACTTCTCACCCCAGGGCATACCCTACCACAGCGTC
GAAACTCTCATCGTCGAGGCTCCTGACTACGGGCACGAAACTACATCGGAAG
CCTACTCGTTTTGGCTCTGGCTAGAGGCTACCTACGGTGCGGTTACCGGCAAT

TGGACTCCGTTCAACAACGCGTGGACGACCATGGAGACGTACATGATTCCAC
AACATGCCGATCAACCGAACAATGCCTCTTATAACCCGAACAGTCCTGCTTCA
TATGCACCAGAAGAACCGCTGCCATCTATGTATCCCGTCGCAATCGATTCTTC
AGTGCCAGTTGGTCATGATCCACTCGCAGCAGAGTTGCAATCTACATATGGA
ACCCCCGATATTTATGGGATGCACTGGTTGGCCGACGTGGACAACATTTATGG
CTATGGCGACTCTCCAGGAGGCGGATGCGAGCTTGGTCCTTCAGCGAAAGGC
GTATCTTATATCAACACCTTCCAGCGGGGTAGTCAAGAGAGTGTCTGGGAAA
CAGTTACACAGCCTACGTGCGACAACGGAAAGTACGGTGGGGCTCATGGTTA
CGTCGATCTTTTCATCCAGGGATCAACACCACCGCAATGGAAATATACGGAC
GCACCCGATGCTGACGCGCGGGCCGTGCAGGCAGCATACTGGGCGTACACCT
GGGCAAGTGCGCAAGGCAAAGCTTCCGCAATCGCCCCTACAATAGCCAAGGC
TGCTAAATTGGGTGACTATCTTCGATACTCTCTCTTCGATAAATACTTCAAAC
AGGTGGGCAACTGTTATCCTGCCAGTTCGTGCCCAGGCGCCACCGGAAGACA
GTCTGAAACATACCTGATTGGATGGTATTATGCTTGGGGTGGAAGTTCTCAGG
GCTGGGCTTGGCGCATCGGTGATGGCGCTGCTCATTTTGGATACCAAAACCCA
CTTGCGGCCTGGGCCATGTCAAACGTCACTCCACTTATCCCGCTGTCCCCCAC
CGCAAAGAGCGACTGGGCCGCCTCTCTCCAGCGCCAATTGGAGTTCTACCAG
TGGCTGCAATCAGCAGAAGGTGCTATTGCGGGCGGGGCTACCAATTCCTGGA
ACGGCAACTATGGCACACCTCCAGCTGGTGACTCTACATTTTACGGCATGGCG
TACGATTGGGAACCTGTTTATCACGACCCCCCTTCTAATAATTGGTTCGGCTTT
CAAGCATGGTCCATGGAGAGAGTCGCTGAGTACTACTACGTTACAGGCGACC
CAAAAGCCAAGGCCCTGCTAGATAAGTGGGTTGCTTGGGTCAAGCCAAACGT
AACTACAGGCGCATCATGGTCTATCCCATCCAATCTGTCCTGGTCTGGCCAAC
CAGATACCTGGAATCCATCCAACCCGGGGACCAACGCGAACCTCCATGTCAC
TATAACCTCTTCGGGACAAGATGTCGGCGTGGCCGCGGCTCTTGCAAAAACG
TTGGAGTACTACGCCGCGAAGTCCGGAGACACCGCGTCCAGAGATTTGGCCA
AAGGCCTCCTCGATAGCATTTGGAACAATGATCAAGACAGCTTGGGAGTAAG
CACGCCAGAGACAAGGACTGACTATTCCCGCTTTACTCAAGTTTACGACCCGA
CCACCGGCGATGGCCTCTATATTCCTTCTGGCTGGACAGGTACTATGCCCAAC
GGCGACCAAATCAAGCCAGGCGCTACATTTCTTTCCATTCGCTCGTGGTATAC
GAAGGACCCTCAATGGTCAAAGGTTCAGGCATATCTTAACGGCGGCCCTGCA
CCAACCTTTAATTACCACAGGTTCTGGGCCGAATCTGATTTCGCCATGGCTAA
CGCTGACTTCGGTATGCTCTTCCCATCTGGAAGCCCGTCACCAACCCCCTCAC
CTACTCCTACATCTTCGCCCTCCCCGACGCCTTCGTCTTCACCAACACCCTCTC
CCTCCCCCTCTCCTACCGGCGACACAACTCCGCCTAGTGTGCCCACCGGGCTC
CAGGTCACCGGCACCACAACGTCATCAGTCAGCCTGTCTTGGACCGCATCTAC
CGACAACGTTGGTGTGGCTCATTACAACGTTTATAGGAATGGCACTTTGGTCG
GACAGCCAACCGCGACATCTTTCACCGACACTGGTTTGGCGGCGGGAACCTC
TTACACTTATACAGTAGCTGCTGTGGACGCTGCAGGTAATACCTCTGCACAAT
CTAGCCCAGTGACCGCCACAACCGCCTCTCCCTCCCCTTCACCATCGCCTTCT
CCCACACCTACTTCATCACCATCCCCCACACCTAGCCCTACCCCCTCTCCAAC
ATCAACATCGGGCGCATCGTGCACCGCCACATACGTAGTCAACTCCGATTGG
GGCTCCGGTTTCACCACAACTGTTACTGTGACCAACACTGGCACCCGTGCGAC
TTCCGGCTGGACGGTTACGTGGTCCTTCGCTGGCAATCAAACCGTTACAAACT
ACTGGAATACCGCACTCACGCAGTCGGGCAAGAGTGTCACGGCCAAAAACCT
CAGCTATAATAATGTTATCCAACCAGGGCAGTCTACGACCTTCGGATTCAACG
GTTCCTATTCGGGGACAAATACCGCTCCTACACTCAGTTGTACTGCCTCCTAA

ATGCACCATGCTATGCGGCGTATGGTAACATCTGCCTCAGTTGTCGGCGTCGC
TACTCTGGCGGCCGCTACCGTCCTTATCACAGGAGGAATCGCCCATGCCGCAT
CTACTCTAAAGCAGGGAGCCGAAGCTAATGGAAGATATTTTGGAGTCTCAGC
TTCCGTGAATACCCTTAACAATAGTGCCGCAGCAAATCTTGTCGCAACCCAAT
TCGACATGCTTACCCCAGAGAACGAGATGAAATGGGATACAGTGGAAAGCTC
CAGAGGTTCCTTTAATTTCGGGCCAGGAGATCAAATCGTTGCATTTGCTACAG
CCCATAATATGCGCGTTAGAGGGCATAATCTGGTATGGCATTCTCAACTTCCA
GGATGGGTCTCGTCACTTCCACTGAGCCAGGTGCAGTCTGCTATGGAGAGTCA
TATCACAGCAGAGGTCACGCACTACAAGGGCAAAATATACGCATGGGACGTT
GTGAACGAGCCTTTTGATGACTCTGGTAACCTTCGTACAGATGTTTTCTACCA
GGCAATGGGTGCAGGGTACATCGCTGACGCTCTGCGAACTGCGCATGCTGCT
GACCCAAACGCAAAGCTCTACCTTAACGACTATAATATTGAGGGTATTAACG
CTAAAAGTGACGCTATGTACAACCTCATCAAACAACTTAAGTCACAGGGAGT
CCCTATTGATGGCGTAGGATTCGAAAGCCACTTCATTGTGGGCCAAGTGCCCT
CCACACTCCAACAGAATATGCAGCGTTTTGCTGATCTCGGAGTCGATGTTGCC
ATAACAGAATTAGATGACAGGATGCCTACTCCGCCTTCCCAACAAAACCTTA
ATCAACAGGCCACCGATGATGCTAACGTGGTAAAAGCTTGCTTGGCGGTTGC
TCGATGTGTAGGAATTACACAGTGGGATGTAAGCGACGCAGATTCTTGGGTT
CCTGGCACCTTCTCAGGTCAGGGCGCCGCAACTATGTTTGATAGCAATTTACA
ACCAAAGCCTGCTTTCACTGCCGTCTTGAACGCGCTTTCTGCATCCGCCTCTGT
ATCACCTTCTCCGTCCCCGTCACCCTCCCCTTCTCCAAGCCCATCTCCGTCACC
ATCACCTTCACCTAGCCCATCACCATCTCCATCACCTTCCCCTTCCTCTTCTCC
AGTCAGTGGCGGTGTTAAAGTTCAATATAAGAATAACGATTCCGCTCCGGGA
GACAACCAGATAAAACCTGGCCTGCAAGTAGTTAATACTGGATCGTCATCGG
TTGATCTGAGTACGGTTACCGTTAGATACTGGTTCACACGAGACGGAGGATCT
TCCACATTGGTTTACAATTGCGACTGGGCTGTTATGGGTTGTGGTAATATTCG
CGCTAGCTTTGGATCAGTTAATCCAGCAACCCCTACGGCTGATACGTATCTAC
AACTCTCCTTCACAGGAGGCACACTACCCGCAGGAGGATCAACCGGTGAGAT
ACAGTCCAGGGTTAACAAAAGCGACTGGTCAAACTTCACTGAGACCAATGAC
TACAGCTATGGTACTAACACCACCTTCCAAGATTGGTCAAAGGTCACTGTATA
CGTTAATGGTCGATTGGTCTGGGGCACCGAACCTTCCGGAACATCCCCCTCTC
CAACACCATCTCCTAGTCCAACCCCATCTCCAAGCCCTTCCCCATCTCCCAGT
CCTTCACCTTCGCCATCCCCCTCACCATCCCCATCTCCGTCTTCTTCTCCGAGT
TCGGGCTGCGTGGCATCTATGAGAGTTGATTCTAGCTGGCCTGGCGGTTTTAC
AGCCACTGTTACTGTGTCCAACACTGGAGGCGTCTCTACTTCAGGCTGGCAAG
TTGGCTGGAGCTGGCCTTCAGGCGATAGTTTAGTAAACGCGTGGAATGCAGTT
GTTTCTGTTACAGGTACCAGTGTTAGAGCTGTGAATGCAAGCTATAATGGAGT
GATCCCCGCAGGAGGATCAACCACTTTCGGTTTCCAGGCGAATGGCACACCA
GGCACACCGACGTTTACTTGTACTACCTCAGCAGATCTCTAA.

Após otimização de códon, a seguinte seqüência (SEQ ID NO.3) para a família de 10 enzimas foi usada para expressão nas plantas:

FAVOR INSERIR SEQÜÊNCIA À PÁGINA 80 DO RELATÓRIO ORIGINAL EM INGLÊS.

Exemplo 9. Método de Classificação para a Identificação Rápida de Celulase Microbial

Substrato de celulose purificado carbóxi-metil-celulose (CMC) foi usado com agar para formar um meio sólido que foi derramado em placas de Petri. Conforme já mencionado acima, quando hidrolisada pelas enzimas celulase, tais como E1 endoglucanase de Acidothermus cellulolyticus, CMC não é mais reativa ao corante Congo Red. A biomassa de tabaco transgêni-

co que expressa o gene E1 foi colocada diretamente na superfície de placas de CMC, e permitidas incubar a 65°C por trinta minutos. Esta temperatura é próxima à temperatura otimizada para atividade de E1 (Z. Dai et al., Mol. Breeding, 2000, 6: 277-285; Z. Dai et al., Transg. Res., 2000, 9: 43-54), e não causa fusão da placa de CMC. Após incubação, a biomassa de tabaco foi removida, e a placa de CMC foi inundada com Congo Red para manchar a celulose no meio. Em contraste às folhas de tabaco não-transformadas tipo selvagem (vide Figura 20A), as folhas de tabaco de E1 foram observadas para hidrolisar claramente o CMC adjacente, impedindo Congo red de manchar o meio, e produzindo uma zona em forma de folha clara (vide Figura 20B).

Este método pode ser usado para avaliar rapidamente a atividade de celulase de enzimas (por exemplo, enzimas microbiais) transientemente expressas pelas amostras de folhas (ou outro tecidos de planta).

Outras Concretizações

Outras concretizações da invenção serão aparentes àqueles versadas na técnica a partir de uma consideração do relatório descritivo ou prática da invenção aqui descrita. É pretendido que o relatório descritivo e exemplos sejam considerados como exemplares somente, com o escopo verdadeiro da invenção sendo indicado pelas reivindicações que se seguem.

REIVINDICAÇÕES

1. Planta transgênica, o genoma da qual é aumentado com:

um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima lignocelulolítica operavelmente ligada a uma seqüência promotora, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta,

em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é produzida em um nível maior do que 0,5% da proteína solúvel total, maior do que 5% da proteína solúvel total, maior do que 10% da proteína solúvel total, ou maior do que 20% da proteína solúvel total.

2. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é selecionada a partir do grupo consistindo em celulase, uma hemicelulase, uma ligninase, e combinações destas.

3. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica exibe baixa atividade a uma temperatura abaixo de 30°C, abaixo de 50°C, ou abaixo de 60C.

4. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é expressa constitutivamente ou especificamente em tecido.

5. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é expressa em um tecido de planta selecionado a partir do grupo consistindo em talos e folhas.

6. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela.

7. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 6, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela, selecionada a partir do grupo consistindo em apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo.

8. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a planta é uma planta monocotiledônia.

9. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a

planta é uma planta dicotiledônia.

10. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a planta é uma planta de colheita.

11. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, em que a planta é selecionada a partir do grupo consistindo em milho, grama, sorgo, "miscanthus", cana de açúcar, álamo, pinho, trigo, arroz, soja, algodão, cevada, grama de relvado, tabaco, bambu, colza, beterraba, girassol, salgueiro e eucalipto.

12. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, o genoma da qual é adicionalmente aumentado com:

um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima de amilase operavelmente ligada a uma seqüência promotora, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta.

13. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 12, em que a enzima amilase compreende enzima alfa-amilase ou enzima glucoamilase.

14. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 12, em que a pelo menos uma enzima amilase é produzida em um nível maior do que 10% da proteína solúvel total, maior do que 25% da proteína solúvel total, ou maior do que 50% da proteína solúvel total.

15. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 12, em que a pelo menos uma enzima amilase é expressa constitutivamente ou especificamente em tecido.

16. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 15, em que a pelo menos uma enzima amilase é expressa em um tecido de planta selecionado a partir do grupo consistindo em talos e folhas.

17. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 12, em que a pelo menos uma enzima amilase é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela.

18. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 17, em que a pelo menos uma enzima amilase é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela selecionado a partir do grupo consistindo em

apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo.

19. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, o genoma da qual é adicionalmente aumentado com:

um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas operavelmente ligada a uma seqüência promotora, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta.

20. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 19, em que a proteína com propriedades bactericidas compreende um antibiótico.

21. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 19, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é produzida em um nível maior do que 1% da proteína solúvel total, maior do que 5% da proteína solúvel total, ou maior do que 10% da proteína solúvel total.

22. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 19, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é expressa constitutivamente ou especificamente em tecido.

23. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 22, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é expressa em um tecido de planta selecionado a partir do grupo consistindo em sementes, talos e folhas.

24. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 19, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela.

25. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 24, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela selecionado a partir do grupo consistindo em apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo.

26. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 19, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é efetiva contra espécies bacteriais que reduzem as produções de etanol durante processamento pela produção de substâncias que são tóxicas à levedura, ou pelo consumo de glicose e redução de glicose para fermentação em etanol.

27. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, o genoma da qual é adicionalmente aumentado com:

um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima para conversão de açúcares difíceis de fermentar em açúcares mais facilmente fermentáveis ligados operavelmetne a uma seqüência promotora, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta.

28. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 27, em que a enzima é um isomerase que converte xilose em xilanose.

29. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 28, em que a pelo menos uma enzima é produzida em um nível maior do que 0,5% da proteína solúvel total, maior do que 5% da proteína solúvel total, maior do que 10% da proteína solúvel total, ou maior do que 20% da proteína solúvel total.

30. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, 12, 19 ou 28, o genoma da qual é adicionalmente alterado de modo a minimizar dispersão dos transgenes através da reprodução da planta.

31. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 30, o genoma da qual é alterado de modo a introduzir esterilidade macho na planta, ou retardar a floração da planta.

32. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, 12, 19 ou 28, o genoma da qual é adicionalmente alterado de modo a reduzir a quantidade de uma ou mais formas de lignina na planta transgênica em relação à celulose e a hemicelulose.

33. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, 12, 19 ou 28, o genoma da qual é adicionalmente alterado de modo a aumentar a quantidade de uma ou mais formas de celulose na planta transgênica em relação à lignina e hemicelulose.

34. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 1, 12, 19 ou 28, o genoma da qual é adicionalmente alterado de modo a aumentar a quantidade de uma ou mais formas de hemicelulose na planta transgênica em relação à lignina e celulose.

35. Planta transgênica o genoma da qual é aumentado com:

um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima lignocelulítica operavelmente ligada a uma seqüência promotora, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta; e

um polinucleotídeo recombinante que reduz a expressão de um gene promotor de flor, ou que aumenta um gene repressor de flor, operavelmente ligado a um promotor.

36. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a floração da planta transgênica é retardada.

37. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a produção de biomassa na planta transgênica é intensificada.

38. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a pelo menos uma enzima lignocelulítica é produzida em um nível maior do que 0,5% da proteína solúvel total, maior do que 5% da proteína solúvel total, maior do que 10% da proteína solúvel total, ou maior do que 20% da proteína solúvel total.

39. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é selecionada a partir do grupo consistindo em celulase, uma hemicelulase, uma ligninase, e combinações destas.

40. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é expressa especificamente em tecido.

41. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 40, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é expressa em um tecido de planta selecionado a partir do grupo consistindo em sementes, talos e folhas.

42. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela.

43. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 42, em que a pelo menos uma enzima lignocelulolítica é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela selecionada a partir do grupo consistindo em apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo.

44. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a planta é uma planta monocotiledônia.

45. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a planta é uma planta dicotiledônia.

46. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a planta é uma planta de colheita.

47. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a planta é selecionada a partir do grupo consistindo em milho, grama, sorgo, "miscanthus", cana de açúcar, álamo, pinho, trigo, arroz, soja, algodão, cevada, grama de relvado, tabaco, bambu, colza, beterraba, girassol, salgueiro e eucalipto.

48. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, o genoma da qual é adicionalmente aumentado com:

um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima de amilase operavelmente ligada a uma seqüência promotora, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta.

49. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a enzima amilase compreende enzima alfa-amilase ou enzima glucoamilase.

50. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a pelo menos uma enzima amilase é produzida em um nível maior do que 10% da proteína solúvel total, maior do que 25% da proteína solúvel total, ou maior do que 50% da proteína solúvel total.

51. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a pelo menos uma enzima amilase é expressa constitutivamente ou especificamente em tecido.

52. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 51, em que a pelo menos uma enzima amilase é expressa em um tecido de planta selecionado a partir do grupo consistindo em talos e folhas.

53. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, em que a pelo menos uma enzima amilase é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela.

54. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 53, em que a pelo menos uma enzima amilase é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela selecionada a partir do grupo consistindo em apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo.

55. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, o genoma da qual é adicionalmente aumentado com:

um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas operavelmente ligada a uma seqüência promotora, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta.

56. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 55, em que a proteína com propriedades bactericidas compreende um antibiótico.

57. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 55, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é produzida em um nível maior do que 0,1% da proteína solúvel total, maior do que 1% da proteína solúvel total, maior do que 5% da proteína solúvel total, ou maior do que 10% da proteína solúvel total.

58. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 55, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é expressa constitutivamente ou especificamente em tecido.

59. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 58, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é expressa em um tecido de planta selecionado a partir do grupo consistindo em sementes, talos e folhas.

60. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 54, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela.

61. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 60, em que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é expressa em um compartimento subcelular alvo ou organela selecionada a partir do grupo consistindo em apoplasto, cloroplasto, parede celular e vacúolo.

62. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 54, em

que a pelo menos uma proteína com propriedades bactericidas é efetiva contra espécies bacteriais que reduzem as produções de etanol durante processamento pela produção de substâncias que são tóxicas à levedura, ou pelo consumo de glicose e redução de glicose disponível para fermentação em etanol.

63. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, o genoma da qual é adicionalmente aumentado com:

um polinucleotídeo recombinante que codifica pelo menos uma enzima para conversão de açúcares difíceis de fermentar em açúcares mais facilmente fermentáveis ligados a uma seqüência promotora, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão na planta.

64. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 63, em que a enzima é um isomerase que converte xilose em xilanose.

65. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 64, em que a pelo menos uma enzima é produzida em um nível maior do que 5% da proteína solúvel total, maior do que 10% da proteína solúvel total, ou maior do que 20% da proteína solúvel total.

66. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, 48, 55 ou 63, o genoma da qual é adicionalmente alterado de modo a minimizar dispersão dos transgenes através da reprodução da planta.

67. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 66, o genoma da qual é alterado de modo a introduzir esterilidade macho na planta, ou retardar a floração da planta.

68. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, 48, 55 ou 63, o genoma da qual é adicionalmente alterado de modo a reduzir a quantidade de uma ou mais formas de lignina na planta transgênica em relação à celulose e a hemicelulose.

69. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, 48, 55 ou 63, o genoma da qual é adicionalmente alterado de modo a aumentar a quantidade de uma ou mais formas de celulose na planta transgênica em relação à lignina e hemicelulose.

70. Planta transgênica de acordo com a reivindicação 35, 48, 55

ou 63, o genoma da qual é adicionalmente alterado de modo a aumentar a quantidade de uma ou mais formas de hemicelulose na planta transgênica em relação à lignina e celulose.

71. Método pata preparação de etanol com custo efetivo compreendendo as etapas de:

tratar uma parte de planta compreendendo pelo menos uma enzima lignocelulítica sob condições para ativar a pelo menos uma enzima lignocelulítica, degradando, desse modo, lignocelulose, para formar uma mistura de hidrolizato, em que a parte de planta é obtida a partir de uma planta transgênica como definido em qualquer uma das reivindicações 1-70; e

incubar a mistura de hidrolizato sob condições que promovam conversão de açúcares fermentáveis da mistura de hidrolizato em etanol.

72. Método de acordo com a reivindicação 71, em que, antes da etapa de tratamento, a parte de planta não é pré-tratada, ou é pré-tratada sob condições de menos calor ou menos ácido, ou que são de, outro modo, menos severas, ou produzem menos subprodutos tóxicos do que condições usadas no pré-tratamento de biomassa de plantas não-transgênicas.

73. Método de acordo com a reivindicação 71, em que a parte de planta é substancialmente livre de sujidades do solo.

74. Método, de acordo com a reivindicação 72, em que a parte de planta é pré-tratada pelo aquecimento da parte de planta a uma temperatura maior do que 50°C, maior do que 75°C, ou maior do que 100°C.

75. Método de acordo com a reivindicação 72, em que a parte de planta é pré-tratada pela adição de água para diminuir a viscosidade da mistura de hidrolizato.

76. Método de acordo com a reivindicação 72, em que a parte de planta é pré-tratada pelo corte, moagem, desfibramento ou pulverização da parte de planta.

77. Método de acordo com a reivindicação 71, compreendendo adicionalmente adição de enzimas lignocelulíticas externas à parte de planta antes da etapa de tratamento.

78. Método de acordo com a reivindicação 77, em que o método

resulta em produção aumentada de etanol comparada a um método em que a parte de planta é obtida de uma planta não-transgênica.

79. Método de acordo com a reivindicação 71, compreendendo adicionalmente remoção de pelo menos um componente não-fermentável a partir da mistura de hidrolizato antes da etapa de incubação.

80. Método de acordo com a reivindicação 79, em que a remoção do pelo menos um componente não-fermentável acelera a conversão de açúcares fermentáveis em etanol.

81. Método de acordo com a reivindicação 79, em que o pelo menos um componente não-fermentável é selecionado a partir do grupo consistindo em lignina, produtos de quebra de lignina, fenóis, furanos, e combinações destes.

82. Método de acordo com a reivindicação 79, em que a remoção do pelo menos um componente não-fermentável a partir da mistura de hidrolizato compreende separação/isolamento e purificação do pelo menos um componente não-fermentável.

83. Método de acordo com a reivindicação 81, em que o pelo menos um componente não-fermentável é fenol.

84. Método de acordo com a reivindicação 79, em que o pelo menos um componente não-fermentável, ou um derivado deste, é queimado para produzir calor ou eletricidade.

85. Método de acordo com a reivindicação 84, em que o calor produzido é usado no referido método.

86. Método de acordo com a reivindicação 79, compreendendo adicionalmente uma etapa de:

destilar o etanol produzido por conversão de açúcares fermentáveis da mistura de hidrolizato de modo a obter etanol destilado.

87. Método de acordo com a reivindicação 86, em que o pelo menos um componente não-fermentável é adicionado ao etanol destilado como um desnaturante.

88. Método de acordo com a reivindicação 86, em que o pelo menos um componente não-fermentável é adicionado ao etanol produzido

por conversão de açúcares fermentáveis da mistura de hidrolizato antes da etapa de destilação, é destilado com o etanol, e permanece no etanol destilado como um desnaturante.

89. Método de acordo com a reivindicação 86, em que pelo menos um componente não-fermentável é processado em um ou mais compostos que podem ser usados como desnaturantes.

90. Método de acordo com a reivindicação 89, em que o um ou mais compostos que podem ser usados como desnaturantes compreendem álcoois.

91. Método de acordo com a reivindicação 90, em que o um ou mais compostos que podem ser usados como desnaturantes são selecionados a partir do grupo consistindo em metanol e butanol.

92. Método de acordo com a reivindicação 71, compreendendo adicionalmente uma etapa de:

destilar o etanol produzido por conversão de açúcares fermentáveis da mistura de hidrolizato de modo a obter etanol destilado, em que o etanol destilado compreende um ou mais componentes não-fermentáveis que agem como desnaturantes.

93. Método de acordo com a reivindicação 86 ou 92, em que o processo de produção de etanol a partir da biomassa de planta transgênica produz adicionalmente um subproduto que tem valor mais alto de alimento do que um subproduto produzido em um método de produção de etanol, em que a parte de planta é obtida de uma planta não-transgênica.

94. Método de acordo com a reivindicação 93, em que o subproduto compreende grãos de destiladores secos (DDG) que aumentam os níveis de proteína ou óleo, resultante de hidrólise, ou remoção de celulose ou hemicelulose, ou quebra ou remoção de lignina.

95. Método de acordo com a reivindicação 71 ou 86, compreendendo adicionalmente adicionar microorganismos à parte de planta de modo a induzir sacarificação e fermentação simultâneas.

96. Método de acordo com a reivindicação 95, em que os microorganismos fermentam açúcares de seis carbonos, ou açúcares de cinco

carbonos, ou ambos.

97. Método de acordo com a reivindicação 71 ou 87, em que a etapa de incubação da mistura de hidrolizato sob condições que promovem conversão de açúcares fermentáveis da mistura de hidrolizato em etanol compreende adicionar microorganismos à mistura de hidrolizato.

98. Método de acordo com a reivindicação 97, em que os microorganismos fermentam açúcares de seis carbonos ou açúcares de cinco carbonos, ou ambos.

99. Método de acordo com a reivindicação 71, em que a parte de planta compreende partes de planta obtidas de duas ou mais plantas transgênicas como definido em qualquer uma das reivindicações 1-70, em que as plantas transgênicas são das mesmas ou de espécies diferentes, produzem a mesma ou enzima lignocelulítica diferente.

100. Método de acordo com a reivindicação 99, em que as partes de planta são co-processadas de modo a combinar as enzimas lignocelulíticas em uma proporção desejada para aumentar a produção de etanol.

101. Método de acordo com a reivindicação 100, em que as partes de planta são co-processadas de modo a combinar as enzimas lignocelulíticas em uma proporção desejada para aumentar a produção de etanol, alcançando-se hidrólise mais eficiente de polissacarídeos, e quebra e remoção de lignina.

102. Método de acordo com a reivindicação 71, em que a parte de planta compreende partes de planta obtidas de uma planta transgênica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-70, e partes de planta obtidas de uma planta não-transgênica, e o método é realizado usando-se equipamento comum e facilidades para colheita, ensilamento, corte, trituração, moagem, liquefação, sacarificação, fermentação, destilação, secagem, armazenamento ou transporte.

103. Método de acordo com a reivindicação 71, em que as partes de planta compreendem grão de milho e forragem de milho.

104. Método de acordo com a reivindicação 71, em que o genoma das plantas transgênicas é adicionalmente aumentado com um ou

mais genes de levedura para promover sacarificação e fermentação simultâneas.

105. Método de acordo com a reivindicação 71, compreendendo adicionalmente uma etapa de:

tratar a parte de planta sob condições que promovem hidrólise de amido.

106. Método de acordo com a reivindicação 105, em que a etapa de tratar a parte de planta sob condições que promovem hidrólise de amido compreende usar pelo menos uma enzima amilase.

107. Método de acordo com a reivindicação 105, em que a pelo menos uma enzima amilase é selecionada a partir do grupo consistindo em glucoamilase, α-amilase, e combinações destas.

108. Método de acordo com a reivindicação 105, em que a etapa de tratar a parte de planta sob condições para ativar a pelo menos uma enzima lignocelulítica, e a etapa de tratar a parte de planta sob condições para promover hidrólise de amido, são realizadas simultaneamente.

109. Método de acordo com a reivindicação 105, em que a etapa de tratar a parte de planta sob condições para ativar a pelo menos uma enzima lignocelulítica, e a etapa de tratar a parte de planta sob condições para promover hidrólise de amido, são realizadas seqüencialmente.

110. Método de acordo com a reivindicação 105, em que o método é efetuado usando-se equipamento comum e facilidades para colheita, ensilamento, corte, trituração, moagem, liquefação, sacarificação, fermentação, destilação, secagem, armazenamento ou transporte.

111. Método de acordo com a reivindicação 105, em que a parte de planta compreende partes de planta obtidas de duas ou mais plantas transgênicas de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-70, em que as plantas transgênicas são das mesmas ou de espécies diferentes, e produzem as mesmas ou enzimas lignocelulíticas diferentes.

112. Método de acordo com a reivindicação 105, em que a parte de planta compreende partes de planta obtidas a partir da planta transgênica como definido em qualquer uma das reivindicações 1-70, e partes de planta

obtidas de uma planta não-transgênica.

113. Método de acordo com a reivindicação 105, em que a parte de planta compreende grão de milho.

114. Método de acordo com a reivindicação 105, em que a parte de planta compreende um ou mais de grão de milho, fibra de milho e forragem de milho.

115. Método de acordo com a reivindicação 113 ou 114, em que o método é parte de um processo de moagem a seco.

116. Método para recuperação de contaminante em fitorremediação, o método compreendendo etapas de:

introdução, em uma área contaminada, de sementes de uma planta transgênica como definido em qualquer uma das reivindicações 1-70;

crescimento das plantas transgênicas a partir das sementes;

colheita das plantas transgênicas crescidas;

tratamento de uma parte de planta compreendendo pelo menos uma enzima lignocelulítica sob condições para ativar a pelo menos uma enzima lignocelulítica, degradando, desse modo, a lignocelulose, para formar uma biomassa, e liberando contaminante seqüestrado dentro da parte de planta, em que a parte de planta é obtida a partir das plantas transgênicas crescidas colhidas; e

recuperação do contaminante liberado a partir da parte de planta.

117. Método de acordo com a reivindicação 116, compreendendo adicionalmente dispor a biomassa como refugo não-perigoso.

118. Método de acordo com a reivindicação 116, em que, antes da etapa de tratamento, a parte de planta não é pré-tratada, ou é pré-tratada sob condições de calor e ácido que são menos severas do que condições usadas no pré-tratamento de biomassa a partir de plantas não-transgênicas.

119. Método de acordo com a reivindicação 116, em que a parte de planta compreende:

partes de planta obtidas de uma primeira planta transgênica como definido em qualquer uma das reivindicações 1-70, em que a pelo menos

uma enzima oligocelulolítica é uma celulase;

partes de planta obtidas de uma segunda planta transgênica como definido em qualquer uma das reivindicações 1-70, em que a pelo menos uma enzima oligocelulolítica é uma hemicelulase; e

partes de planta obtidas de uma terceira planta transgênica como definido em qualquer uma das reivindicações 1-70, em que a pelo menos uma enzima oligocelulolítica é uma ligninase.

120. Método, de acordo com a reivindicação 116, em que o contaminante compreende um metalóide, tal como arsênico ou selênio, um metal pesado, tal como chumbo, cromo, cádmio, zinco, cobre, ou urânio, ou um poluente orgânico persistente, tais como DDT ou PCBs.

121. Polinucleotídeo otimizado de códon isolado que codifica E1 endoglucanase compreendendo a seqüência de SEQ ID NO. 1, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão em mais do que uma planta.

122. Polinucleotídeo otimizado de códon isolado que codifica família de 48 glicosídeos hidrolase compreendendo a seqüência de SEQ ID NO. 2, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão em mais do que uma planta.

123. Polinucleotídeo otimizado de códon isolado que codifica família de 10 glicosídeos hidrolase compreendendo a seqüência de SEQ ID NO. 3, em que o polinucleotídeo é otimizado para expressão em mais do que uma planta.

124. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 121, 122 ou 123, em que referido polinucleotídeo é otimizado para expressão em milho, arabidopse e tabaco.

125. Célula de planta transgênica transformada usando-se o polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 121, 122 ou 123.

126. Planta transgênica transformada usando-se o polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 121, 122 ou 123.

127. Método compreendendo as etapas de:

provisão de uma seqüência de gene de polinucleotídeo microbial que codifica uma enzima lignocelulítica;

calcular a média de usos de códon de pelo menos uma primeira planta e uma segunda planta para obter uma tabela de uso de códon composto; e

modificar a seqüência de gene de polinucleotídeo usando a tabela de uso de códon composto para gerar um polinucleotídeo de códon otimizado que codifica a enzima lignocelulítica, em que o polinucleotídeo de códon otimizado é otimizado para expressão em mais do que uma planta.

128. Método, de acordo com a reivindicação 127, em que a etapa de calcular a média compreende calcular a média de usos de códon de três plantas diferentes.

129. Método de acordo com a reivindicação 127, em que a etapa de calcular a média compreende calcular a média de usos de códon de quatro plantas diferentes.

130. Método de acordo com a reivindicação 127, em que a etapa de calcular a média compreende calcular a média de usos de códon de quatro plantas diferentes.

131. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-130, em que uma das plantas é uma planta monocotiledônea, e a outra é uma planta dicotiledônea.

132. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 127-130, em que as plantas são selecionadas a partir do grupo consistindo em milho, arabidopse e tabaco.

133. Método de acordo com a reivindicação 127, em que a enzima lignocelulítica é selecionada a partir do grupo consistindo em uma celulase, uma hemicelulase e uma ligninase.

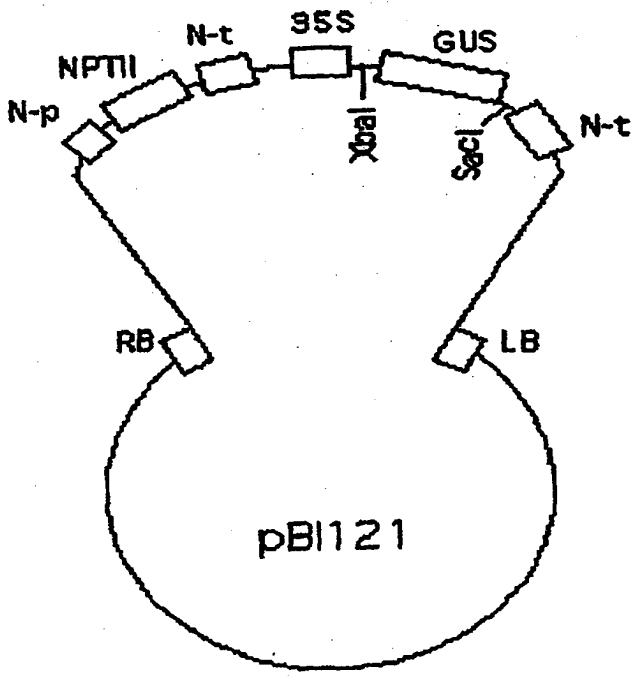


FIG. 1

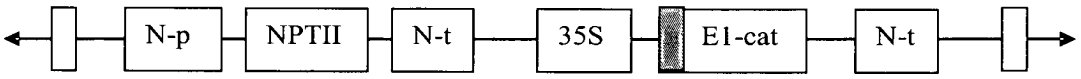


FIG. 2

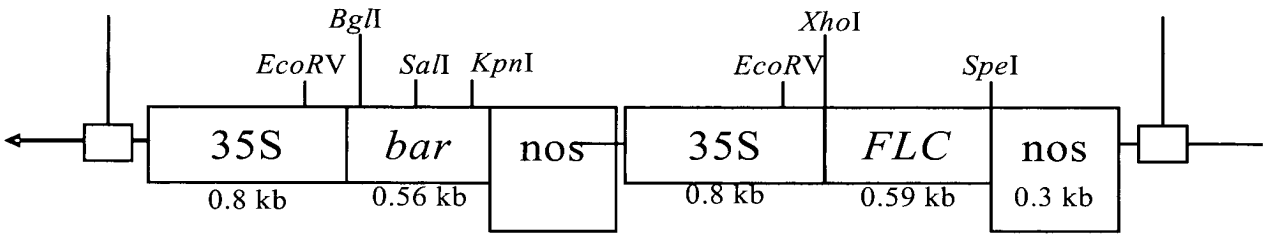

BglI
EcoRV
SalI
KpnI
XhoI
EcoRV
SpeI
35S
bar
nos
35S
FLC
nos
0.8 kb
0.56 kb
0.8 kb
0.59 kb
0.3 kb

FIG. 3

Pré-tratamento				Genótipo e tratamento de tabaco			
				Nenhuma Celulase Adicionada		Celulase Adicionada	
2°C	90°C	pH 4.0	Dry	Controle	E1/FLC	Controle	E1/FLC
				0	0	3.13	3.72
x				0	1.43	3.11	4.19
	x			0	0	3.44	4.50
x	x			0	0	3.08	5.74
		x		0	0	1.33	0.57
x		x		0	0	1.65	0.79
x	x	x		0	0.40	0.82	1.57
			x	0	0.34	4.08	5.58
	x		x	0	0	4.84	4.92

Tabela 1

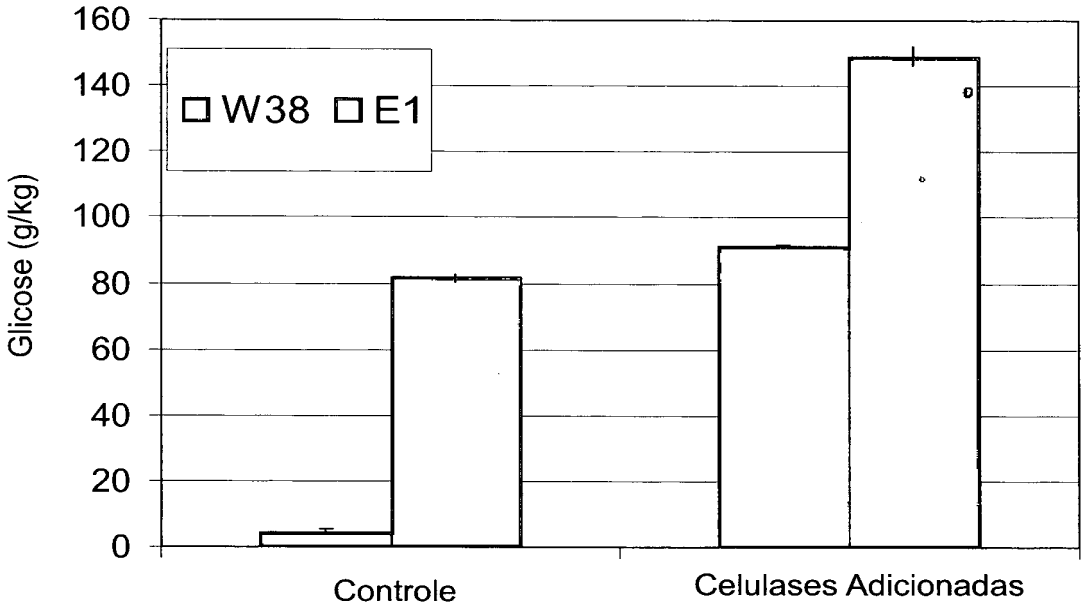

160
140
120
100
80
60
40
20
0
Glicose (g/kg)
W38
E1
Controle
Celulases Adicionadas

FIG. 4

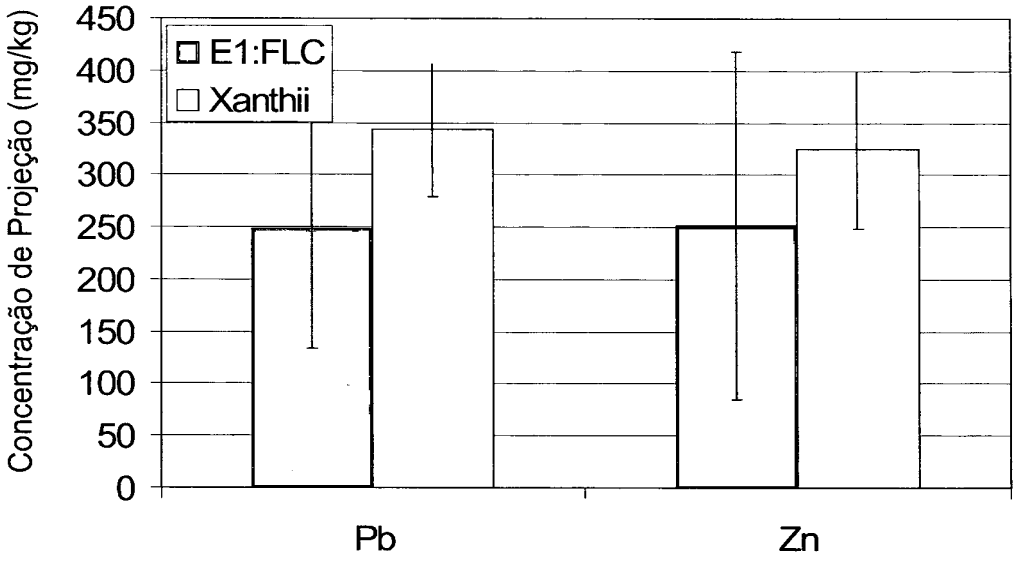

Concentração de Projeção (mg/kg)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
E1:FLC
Xanthii
Pb
Zn

FIG. 5

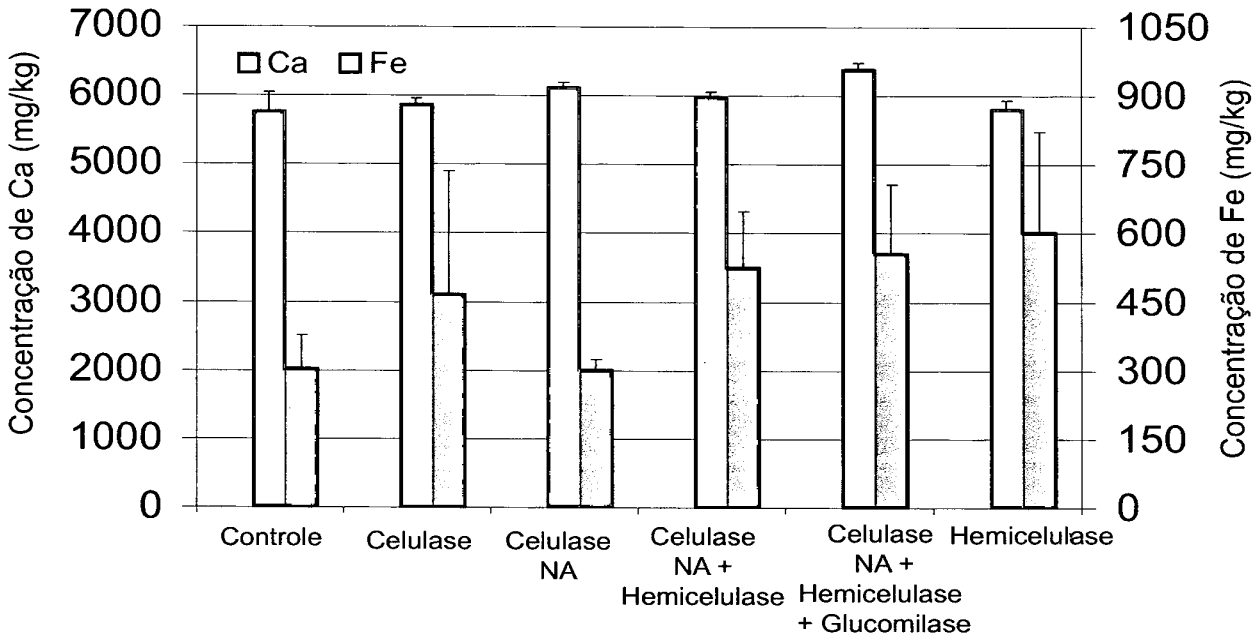

Ca
Fe
Concentração de Ca (mg/kg)
Concentração de Fe (mg/kg)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
1050
900
750
600
450
300
150
0
Controle
Celulase
Celulase NA
Celulase NA + Hemicelulase
Celulase NA + Hemicelulase + Glucomilase
Hemicelulase

FIG. 6

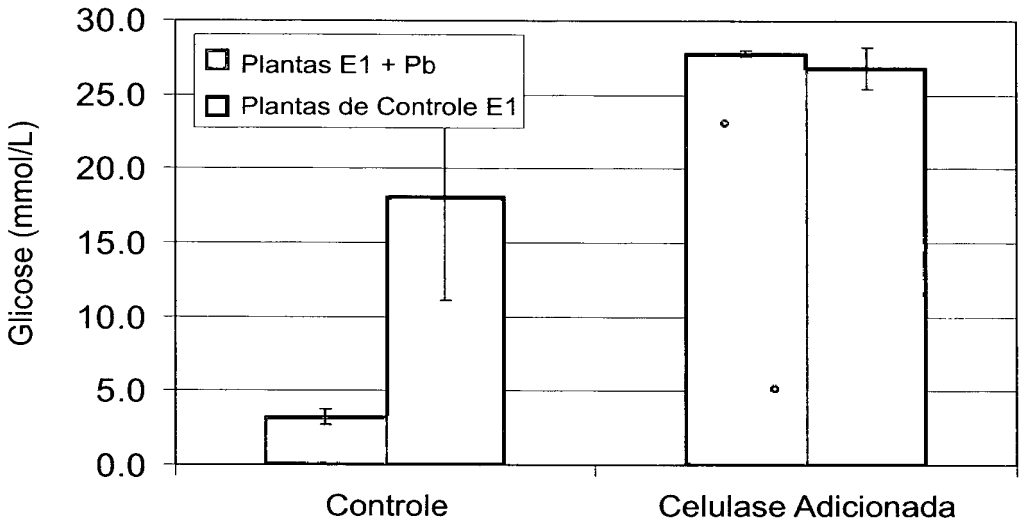

30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
Glicose (mmol/L)
Plantas E1 + Pb
Plantas de Controle E1
Controle
Celulase Adicionada

FIG. 7

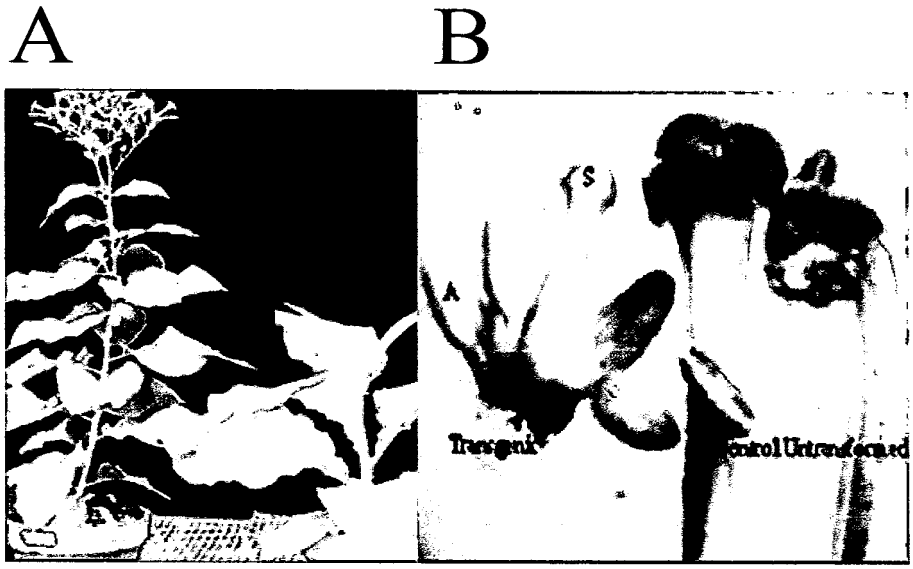


FIG. 8

Tabela 2a

Plantas	Dias para florescimento após transferência para estufa	Retardo de florescimento (d)	N° de folhas produzidas antes do florescimento	Área da folha[a] (cm^2)	Altura da planta no tempo de florescimento (cm)
Controle	15 c[b]	0 c	19 ab	187.5 d	60 a
Transgênico: Linha 1	22 b	7 b	18 ab	213.8 c	35 b
Linha 2	23 b	8 b	20 a	236.5 bc	65 a
Linha 3	24 b	9 b	21 a	239.5 b	35 b
Linha 4	51 a	36 a	16 b	369.7 a	22 c
Linha 5	23 b	8 b	20 a	219.9 bc	40 b

[a]Medida com segunda folha totalmente expandida a partir do fundo.
[b]Em cada coluna; meios seguidos pelas mesmas letras não são significantemente diferentes usando teste de Turkey em nível 1%.

Tabela 2b

Plantas	Biomassa FW/planta	Biomassa FW/planta	Peso da semente em mil	Rendimento de semente/ planta
Controle	192.31 c	35.22 bc	66 c	6.19 b
Transgênico: Linha 1	233.33 c	33.47 c	76 b	3.18 d
Linha 2	338.52 ab	50.48 ab	83 b	7.12 a
Linha 3	260.81 bc	35.58 c	81 b	5.31 c
Linha 4	335.03 ab	51.65 a	101 a	0.17 e
Linha 5	346.06 a	45.79 abc	81 b	3.36 d
	377	43	84	4

Em cada coluna; meios seguidos pelas mesmas letras não são significantemente diferentes usando teste de Turkey em P≤0,01.

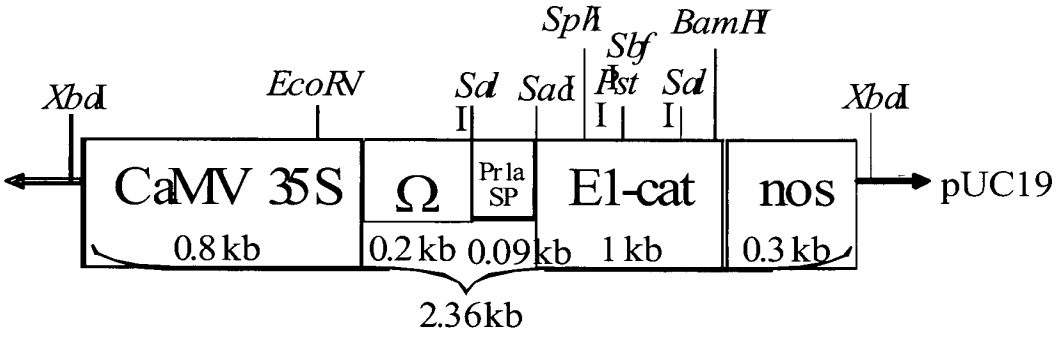

XbaI
EcoRV
SalI
SacI
SphI
SbfI
PstI
SalI
BamHI
XbaI
CaMV 35S
Ω
Prla SP
E1-cat
nos
pUC19
0.8 kb
0.2 kb
0.09kb
1 kb
0.3 kb
2.36kb

FIG. 9

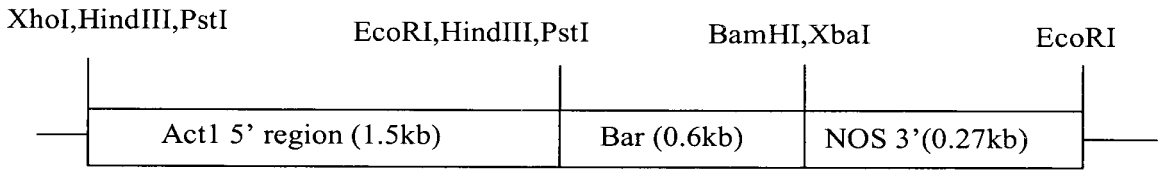

XhoI,HindIII,PstI
EcoRI,HindIII,PstI
BamHI,XbaI
EcoRI
Act1 5' region (1.5kb)
Bar (0.6kb)
NOS 3'(0.27kb)

FIG. 10

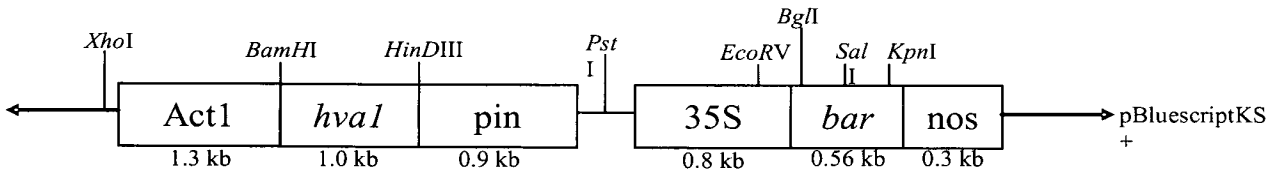

XhoI
BamHI
HinDIII
Pst I
BglI
EcoRV
Sal I
KpnI
Act1
hva1
pin
35S
bar
nos
1.3 kb
1.0 kb
0.9 kb
0.8 kb
0.56 kb
0.3 kb
pBluescriptKS +

FIG. 11

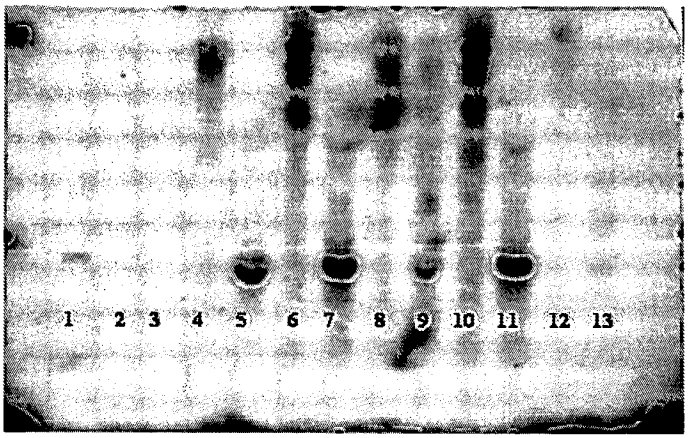
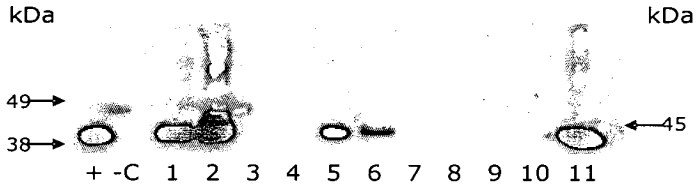


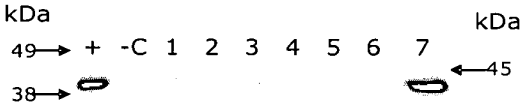
FIG. 12



Manchamento Western de 1 µg de proteína solúvel total de plantas de milho transgênicas que expressam E1. Raias: + controle de tabaco positivo (Austin-Phillips); C, controle de milho negativo (não-transformado); 1-10, linhas de milho transgênicas representando pelo menos 5 eventos de transformação diferentes; 11, arroz transgênico.

1-5: transformado com pMZ766E1cat e pBY520 em 8/29; 6: transformado com pMZ766E1cat e pDM302 em 9/16; 7: transformado com construção de vetor binário 2 e pBY520 em 8/29; 8-9: transformado com pMZ766E1cat e pBY520 em 8/24; 10: transformado com pMZ766E1cat e pDM302 em 9/29.

1, 2, 5 e 6 estão expressando E1. (3 de pMZ766E1cat e pBY520 em 8/29 e 1 de pMZ766E1cat e pDM302 em 9/16). Os outros não têm E1 detectável.



Manchamento Western de 2 µg de proteína solúvel total de plantas de milho transgênicas que expressam E1. Raias: + controle de tabaco positivo (Austin-Phillips); C, controle de milho negativo (não-transformado); 1-6, linhas de milho transgênicas representando pelo menos 4 eventos de transformação diferentes; 7, arroz transgênico.

1-3: transformado com pMZ766E1cat e pBY520 em 8/29; 4: transformado com pMZ766E1cat e pDM302 em 9/16; 5: transformado com construção de vetor binário 2 e pBY520 em 8/29; 6: transformado com pMZ766E1cat e pDM302 em 9/29.

Neste manchamento, somente 3 está expressando uma quantidade fraca de E1. (pMZ766E1cat e pBY520 em 8/29). Os outros não têm E1 detectável

FIG. 13

A B

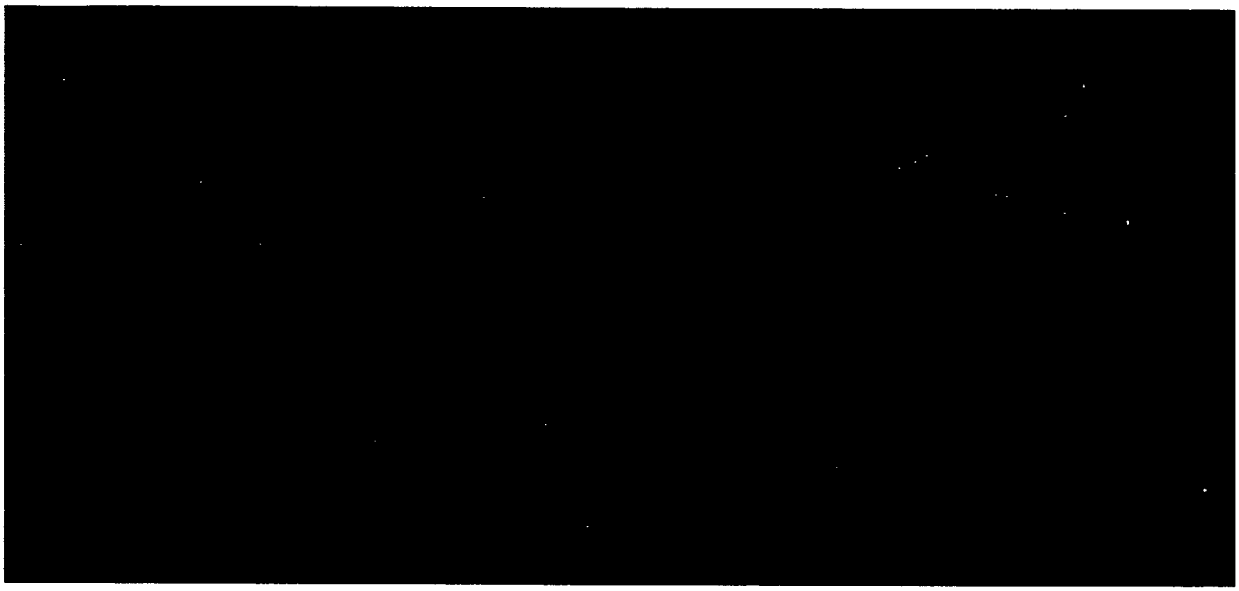


FIG. 14

Tabela 3

Linhas de planta	Atividade (nmol/ug/min)	% de E1 em proteínas solúveis totais
Milho de controle	0.00	0.00
Milho 1-1	0.1044	0.261 %
Milho 1-2	3.629	9.07 %
Milho 1-4	0.0798	0.199 %
Milho 1-6	0.0735	0.184 %
Milho 1-10	0.0124	0.031 %
Milho 1-11	0.186	0.465 %
Milho 1-13	0.0331	0.083 %
Milho 2-3	0.0727	0.182 %
+ tabaco transgênico	1.521	3.8 %
Arroz 8	9.654	24.134 %

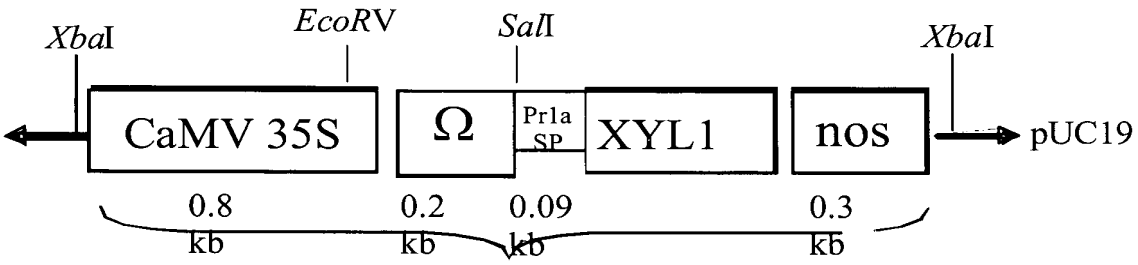

XbaI
EcoRV
SalI
XbaI
CaMV 35S
Ω
Pr1a SP
XYL1
nos
pUC19
0.8 kb
0.2 kb
0.09 kb
0.3 kb

FIG. 15

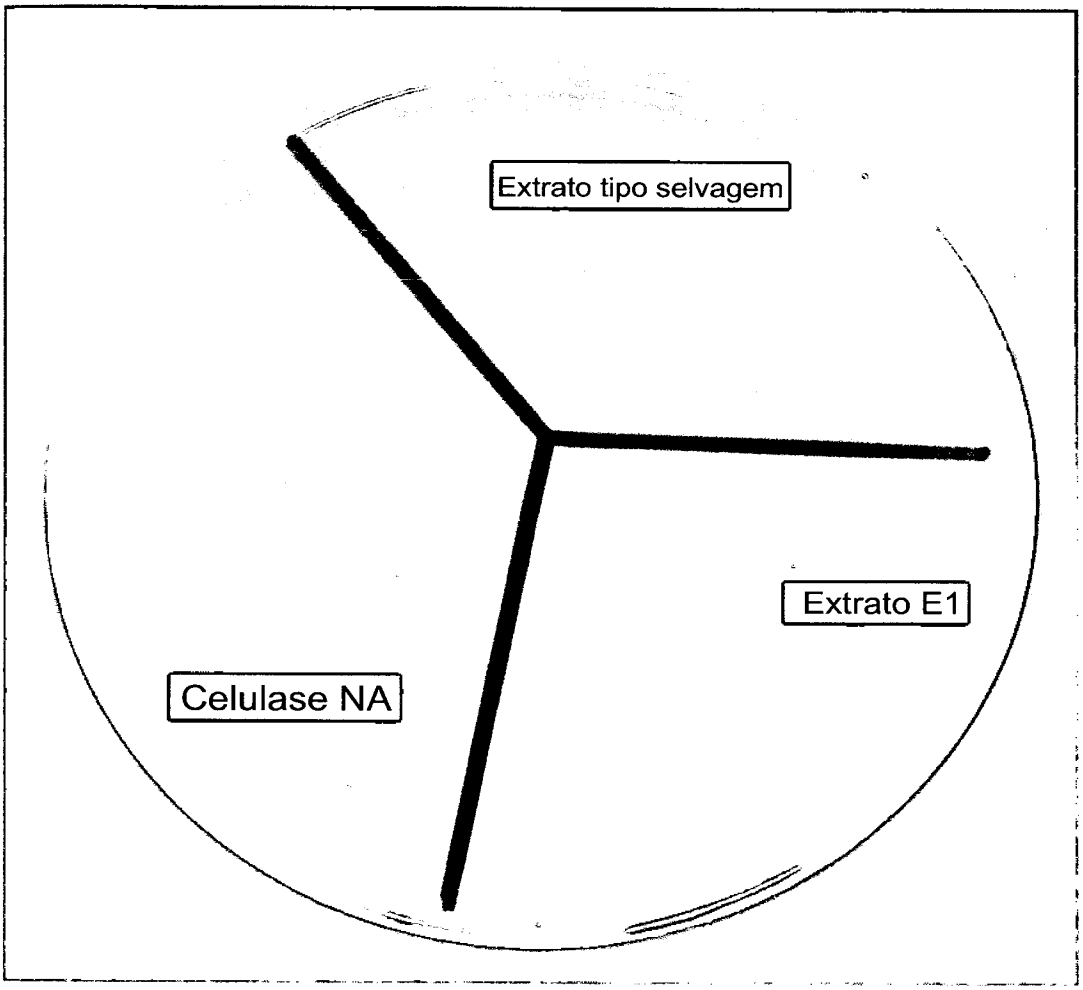


FIG. 16

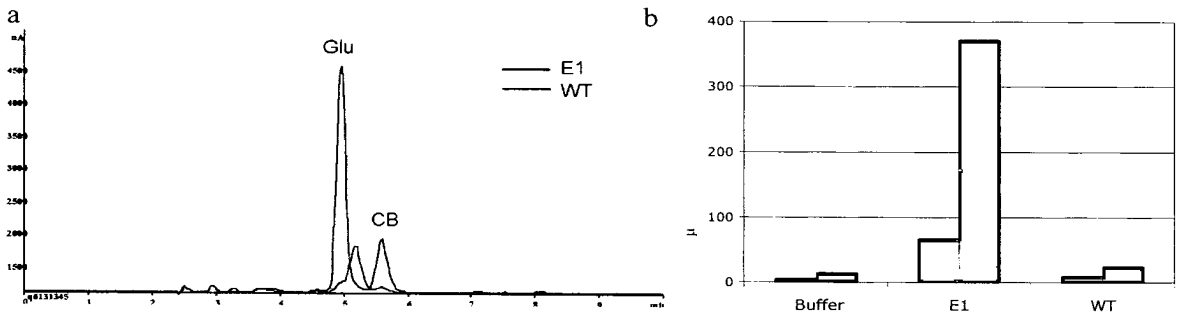


FIG. 17

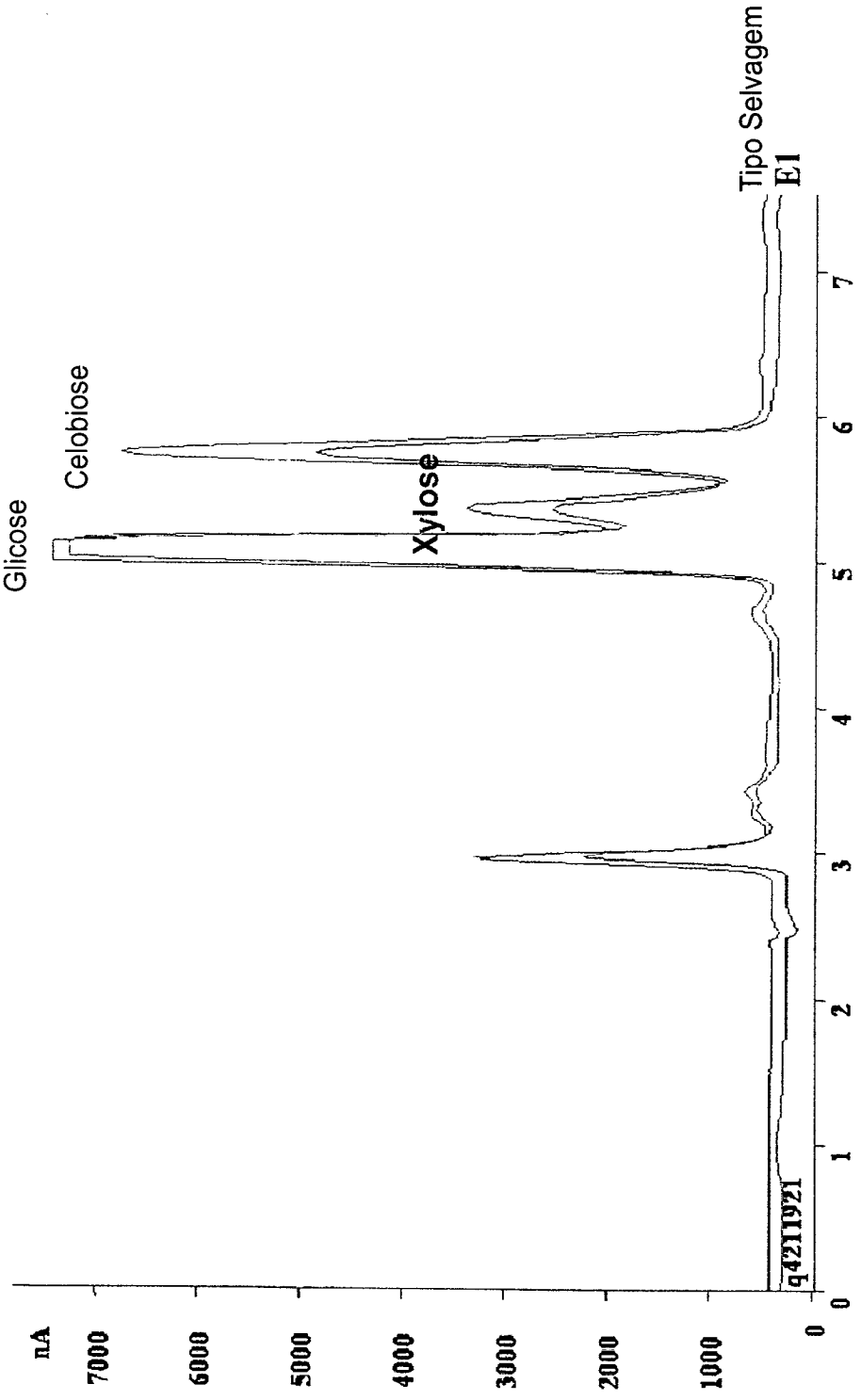

Tipo Selvagem
E1
Glicose
Celobiose
Xylose
nA
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
1
2
3
4
5
6
7
q4211921

FIG. 18

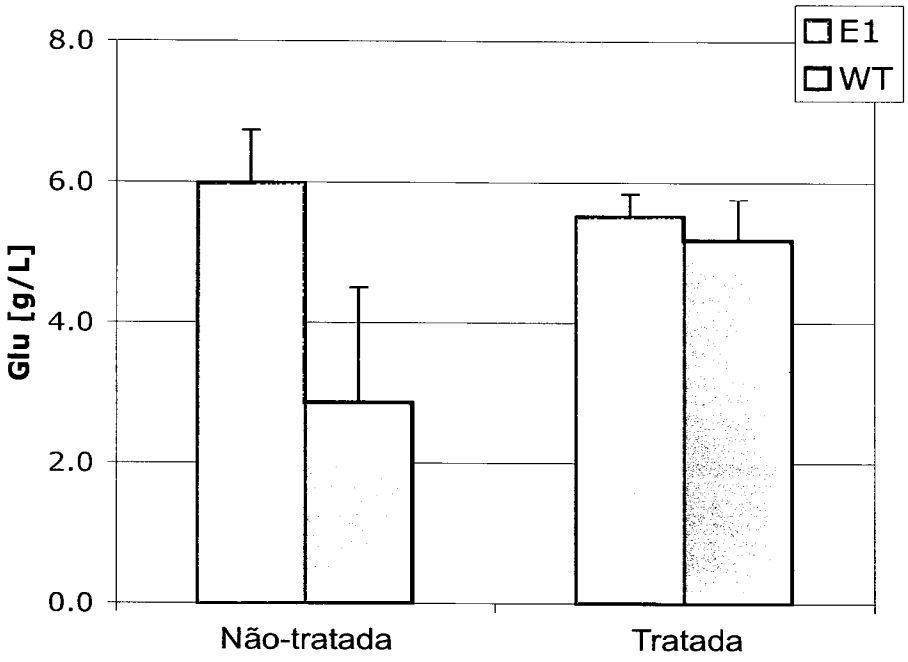


FIG. 19

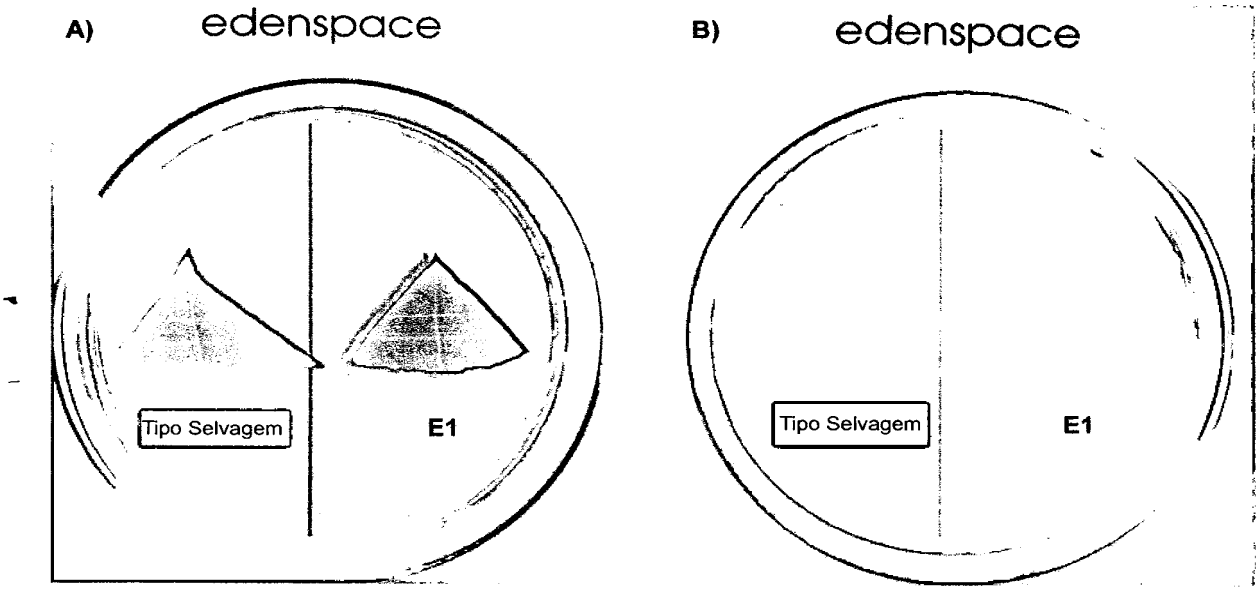


FIG. 20

RESUMO

Patente de Invenção: **"COLHEITAS DE ENERGIA PARA ESTOQUES DE ALIMENTAÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEL APERFEIÇOADOS".**

A presente invenção refere-se a sistemas e métodos aperfeiçoados para redução de custos e aumento de rendimentos de etanol celulósico. Em particular, a presente invenção proporciona plantas geneticamente transformada para biomassa aumentada, expressão de enzimas lignocelulíticas, e simplificação de colheita e processamento a jusante. São também providos métodos para uso destas plantas transgênicas na produção de estoques de alimentação limpos, comercializáveis, para produção de combustíveis renováveis e químicos, e, em outras aplicações, incluindo fitoremediação.